

DNA-Vakzinierung mit Tyrosinhydroxylase-Impfstoffen zur aktiven Immuntherapie des Neuroblastoms

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin

Nicole Hübener

geboren am 30.07.1976 in Lübeck

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. rer. nat. Peter-Michael Kloetzel
2. PD Dr. med. Holger N. Lode
3. Prof. Dr. med. Olaf Witt

Tag der mündlichen Prüfung: 23. März 2007

Abkürzungen	2
Abstract-englisch	4
Abstract-deutsch	5
1. Einleitung	6
1.1. Das Neuroblastom und immuntherapeutische Ansätze	6
1.2. DNA-Vakzine und Applikationsmöglichkeiten	7
1.3. Ubiquitin und das Proteasom	10
1.4. Die Tyrosinhydroxylase	13
1.5. Der eukaryotische Expressionsvektor pCMV-F3Ub	14
1.6. Auswahl der in dieser Arbeit eingesetzten Antigene	16
1.7. Das Design der DNA-Minigen-Vakzine	19
1.8. Selbstantigene und selbstreaktive T-Zellen	20
1.9. Das NXS2-Maus-Modell	22
1.10. Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	20
2.1. Bakterienstämme und Plasmide	20
2.2. Zelllinien	22
2.3. Molekulargenetische Arbeiten	23
2.3.1. Herstellung von DNA-Fragmenten mittels überlappender PCR (Polymerase Ketten-Reaktion)	23
2.3.2. PCR, Klonierung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten	24
2.3.3. Die Herstellung der DNA-Vakzine	26
2.3.4. Elektroporation von elektrokompetenten <i>Salmonella typhimurium</i> SL7207	28
2.3.5. Gerichtete Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>) zum Austausch einer Aminosäure	29
2.3.6. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und RT-PCR	31
2.4. Nachweis von Proteinexpression in Zellen	33
2.4.1. Transfektion von eukaryotischen Zellen	33
2.4.2. Herstellung von Zelllysaten für Western Blots	34
2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten	34
2.4.4. Auftrennung von Zelllysaten mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.4.5. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran (Blotten)	35
2.4.6. Immunfärbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran	36

2.4.7.	Immunfärbung für die Durchflußzytometrie	36
2.4.8.	Durchflußzytometrie	37
2.5.	Histologie und Immunhistochemie von Gewebeschnitten	38
2.5.1.	Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von Paraffinschnitten	38
2.5.2.	Immunhistochemische Färbung von gefrorenen Tumoren	39
2.5.3.	Immunhistochemische Färbung von gefrorenen Nebennieren	40
2.6.	Tierexperimentelle Methoden	40
2.6.1.	Mäuse	40
2.6.2.	Orale Impfung von Mäusen	40
2.6.3.	Tumorzellapplikation und subkutanen Tumorwachstum	41
2.6.4.	Narkose von Mäusen und operative Entfernung von subkutanen Tumoren	41
2.6.5.	Beendigung eines Mausexperiments	42
2.7.	Funktionelle Analyse von murinen Lymphozyten <i>ex vivo</i>	43
2.7.1.	Isolierung von mononukleären Zellen aus lymphatischen Organen	43
2.7.2.	Messung der Aktivität isolierter Lymphozyten mittels IFN- γ -ELISA	44
2.7.3.	Messung der zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten mittels Zytotoxizitäts- Assay	44
2.7.4.	Beladen von MHC-Klasse-I-Molekülen auf SCK-Zellen mit exogenen Peptiden	45
2.8.	Statistik	46
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Konstruktion der unterschiedlichen Minigen-DNAs mittels überlappender PCR	47
3.2.	Subklonierung von Minigen-DNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-F3Ub	46
3.3.	Wiederherstellung des WT-Ub-Gens im Vektor pCMV-F3Ub	47
3.4.	Das Minigen-Design im Vektor pCMV-F3Ub vermittelt die Expression und Polyubiquitinierung der Minigen-Peptide <i>in vitro</i>	48
3.5.	Das Minigen-Design vermittelt einen proteasomalen Abbau der Minigen-Peptide <i>in vitro</i>	51
3.6.	Die Wirksamkeit der DNA-Vakzine <i>mTH3kepis</i>-pCMV-F3Ub und <i>Ersatzepis</i>-pCMV-F3Ub <i>in vivo</i>	53
3.6.1.	Die putativ hoch affinen MHC-Klasse-I-Liganden aus der mTH-Sequenz vermitteln ein reduziertes Tumorwachstum <i>in vivo</i>	54
3.6.2.	Die putativ schwachen MHC-Klasse-I-Liganden aus der mTH-Sequenz vermitteln keine effektive Anti-Tumorantwort <i>in vivo</i>	58

3.6.3.	Das Minigen-Design im Vektor pCMV-F3Ub ist zwingend für eine effektive Anti-Tumorantwort <i>in vivo</i>	62
3.7.	Die durch die DNA-Vakzine induzierte Anti-Tumorantwort <i>in vivo</i> wird durch zytotoxische CD8⁺T-Zellen vermittelt	66
3.7.1.	Infiltration der Tumoren durch CD8 ⁺ T-Zellen nach DNA-Vakzinierung	67
3.7.2.	IFN- γ -Produktion von Milzzellen der geimpften Mäuse	69
3.7.3.	Durch CD8 ⁺ T-Zellen vermittelte Lyse von NXS2-Zellen <i>in vitro</i>	71
3.8.	Spezifität der Erkennung durch CD8⁺T-Zellen	72
3.9.	Untersuchung auf Autoimmunphänomene	75
3.10.	Therapeutische Wirksamkeit der DNA-Vakzinierung mit <i>mTH3kepis</i>-pCMV und <i>Ersatzepis</i>-pCMV	76
4.	Diskussion	81
4.1.	Das Vakzin-Design	79
4.1.1.	Das Neuroblastom - ein MHC-Klasse-I-defizienter Tumor?	79
4.1.2.	Optimierung der MHC-Klasse-I-Liganden	80
4.1.3.	Die Rolle vom Ubiquitin-Ala ₇₆	82
4.2.	Die induzierte Immunantwort ist CTL-vermittelt und spezifisch	85
4.2.1.	Induktion spezifischer CTLs	85
4.2.2.	Induktion eines immunologischen Gedächtnisses?	86
4.2.3.	Experimentell isolierte vs. vorhergesagte MHC-Klasse-I-Liganden	87
4.3.	Bakterielle DNA-Vehikel für den Einsatz beim Menschen	88
4.3.1.	<i>Shigella</i> spp.	89
4.3.2.	<i>Listeria monocytogenes</i>	90
4.3.3.	<i>Salmonella</i> spp.	90
4.3.4.	Sind Salmonellen als Antigen-DNA-Vehikel geeignet?	92
4.4.	Ausblick - Tyrosinhydroxylase-DNA-Vakzine in der Klinik?	94
4.4.1.	Applikationsmöglichkeiten des Impfstoffs	94
4.4.2.	Mögliche Therapieanwendungen	95
5.	Zusammenfassung	79
6.	Summary	81
	Literaturverzeichnis	83
	Anhang	91
	Danksagung	95

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
Amp	Ampicillin
APC(s)	Antigen-präsentierende Zelle(n) (<i>antigen presenting cell(s)</i>)
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	<i>copy</i> DNA
cfu	<i>colony forming unit</i>
Ci	Curie, Einheit der Radioaktivität (1 mCi = 37 MBq)
CIP	Alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i>
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DUB	Deubiquitinierende Enzyme
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verstärkte Lumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflußzytomtrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gy	Grey (Einheit der Röntgenstrahlung)
h	Stunden (<i>hours</i>)
HCl	Salzsäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheiten (international units)

kDa	kilo Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol pro Liter)
min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBMC's	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral mononuclear blood cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtempreatur
s	Sekunden
s.a.	siehe auch
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAA	tumorassoziertes Antigen
Tab.	Tabelle
TAP	transporter associated with antigen presentation
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	unit
Ub	Ubiquitin
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
(m)TH	(murine) Tyrosinhydroxylase
Vol.	Volumenanteile
V	Volt
WT	Wildtyp

Abstract-englisch

Therapeutic vaccination against tumor antigens without induction of autoimmunity remains a major challenge in cancer immunotherapy. Here, we demonstrate for the first time effective therapeutic vaccination followed by eradication of established spontaneous neuroblastoma metastases using a tyrosine hydroxylase (TH) DNA minigene vaccine.

We identified three novel mouse TH (mTH3) derived peptides with high predicted binding affinity to MHC class I H2-K^k according to prediction program *syfpeithi* and computer modeling of epitopes into MHC class I binding groove. Subsequently, a DNA minigene vaccine based on pCMV-F3Ub encoding for mutated ubiquitin (G76 to A76) and mTH3 was generated. Prophylactic and therapeutic efficacy of this vaccine was established following oral delivery using attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207. Only mice immunized with mTH3 were free of spontaneous liver metastases. This effect was clearly dependant on ubiquitin and high affinity of the mTH epitopes to MHC class I. Specifically, we demonstrated a crucial role for minigene expression as a stable ubiquitin-Ala76 fusion peptide for vaccine efficacy. Interestingly, the unstable wild type ubiquitin-Gly76 vaccine was completely ineffective.

The immune response following mTH3 DNA minigene vaccination was mediated by CD8⁺ T-cells as indicated by infiltration of primary tumors and TH specific cytolytic activity in vitro. Importantly, no infiltration was detectable in TH expressing adrenal medulla, indicating the absence of auto immunity.

In summary, we demonstrate effective therapeutic vaccination against neuroblastoma with a novel rationally designed tyrosine hydroxylase minigene vaccine without induction of autoimmunity providing an important base line for clinical application of this strategy.

Abstract-deutsch

Das Neuroblastom ist der am weitesten verbreitete solide, extrakranielle Tumor im Kindesalter. Trotz intensiver Forschung sind die Überlebensraten von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorwachstum nach wie vor schlecht. Die Idee, eine zelluläre, langanhaltende Immunantwort im Körper zu induzieren, vermittelt durch zytotoxische CD8⁺T-Zellen, die sich gegen den Tumor richten, scheint dabei besonders attraktiv. Als tumorassoziertes Antigen (TAA) wurde zu diesem Zweck für diese Arbeit die murine Tyrosinhydroxylase (mTH), das Schrittmacherenzym der Katecholaminbiosynthese, gewählt, da sie in der Mehrzahl der Neuroblastome stark überexprimiert ist.

Für die Impfexperimente wurden sog. DNA-Minigen-Vakzine, die für Peptide aus der mTH-Sequenz kodieren, konstruiert. Die Auswahl Minigen-Peptide erfolgte mit dem MHC-Klasse-I-Liganden-Vorhersageprogramm *syfpeithi*, welches drei vorhergesagte starke H2-K^k-Liganden lieferte (*mTH3k*). Außerdem wurden zwei weitere Vakzine hergestellt: als Negativkontrolle das Vakzin *mTHlowest*, dessen mTH-Peptide laut *syfpeithi* schlechte MHC-Klasse-I-Liganden darstellen und das Vakzin *Ersatzepis*, dessen Peptide auf der Oberfläche von murinen NXS2-Neuroblastomzellen aus MHC-Klasse-I-Komplexen isoliert werden konnten.

Sowohl in prophylaktischen als auch therapeutischen Impfversuchen in Mäusen konnte das Tumorwachstum und die spontane Metastasierung in sekundäre Organe wie die Leber signifikant verhindert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der Antitumoreffekt auf der Induktion mTH-spezifischer, zytotoxischer CD8⁺T Zellen (CTLs) beruht.

Zusätzlich und insbesondere interessant für eine eventuelle klinische Anwendung eines auf der TH basierenden DNA-Vakzins verursachte das mTH-Minigen-Vakzin zumindest in Mäusen keine Aktivierung selbst-reaktiver CD8⁺T-Zellen.

Alles in allem lassen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse den Schluß zu, daß sich die Tyrosinhydroxylase als TAA in Form eines DNA-Vakzins zur adjuvanten Therapie des Neuroblastoms eignet.

1. Einleitung

Krebs ist nach wie vor eine der Haupttodesursachen weltweit. Laut Weltgesundheitsorganisation WHO wird bei 10 Millionen Menschen jährlich Krebs diagnostiziert. Schätzungen zufolge wird sich die Zahl der Neuerkrankungen bis zum Jahr 2020 auf 15 Mio. Menschen jährlich erhöhen. Krebs fordert zur Zeit jährlich ca. 6 Mio. Menschenleben, was rund 12% aller Todesfälle weltweit entspricht (World Health Organisation (WHO) 2004).

1.1. Das Neuroblastom und immuntherapeutische Ansätze

Das Neuroblastom ist ein vom sympathischen Nervengewebe ausgehender neuroektodermaler Tumor des Kleinkindesalters, der bei über 50% der Ersterkrankungen bereits im metastasierten Stadium 4 vorliegt. Das Neuroblastom ist der häufigste solide, extrakranielle Tumor des Kindesalters und hat einen Anteil von 7-8% aller Malignome bei pädiatrischen Patienten. Pro Jahr wird bei ungefähr 130 Kindern in Deutschland ein Neuroblastom diagnostiziert, was einer Inzidenz von 1 Kind/100.000 entspricht (GPOH & Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2004). Die Heilungschancen eines Neuroblastompatienten im Stadium 4 haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten nur unwesentlich verbessert: die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 35-40% (Goldsby & Matthay 2004). Deshalb nehmen die biomedizinische Forschung in diesem Bereich und die Suche nach neuen immuntherapeutischen Strategien einen immer größeren Stellenwert ein.

Dabei sind zwei grundsätzlich unterschiedliche Wege der Immuntherapie, eine Antitumor-Immunantwort im Patienten zu induzieren, voneinander zu unterscheiden: eine passive und eine aktive Immunisierung. Die passive Immunisierung, die hier nur kurz angesprochen werden soll, beschreibt die Gabe von Antikörpern, die sich gegen ein tumorspezifisches Antigen richten. Die erhöhte Expression des Gangliosids GD₂ auf Neuroblastomzellen legte den Grundstein für den ersten klinischen Einsatz eines monoklonalen, murinen Antikörpers beim Neuroblastom. Der anti-GD₂-Antikörper 14G2a hatte aber den Nachteil, bei Patienten Nebenwirkungen auszulösen, die u.a. auf eine Immunreaktionen auf das murine Fremdprotein zurückzuführen waren (Handgretinger *et al.* 1992). Eine Modifizierung des murinen 14G2a zum Maus/Mensch chimären anti-GD₂-Antikörper CH14.18 brachte sowohl eine verbesserte Wirksamkeit als auch eine reduzierte Toxizität mit sich (Handgretinger *et al.*

1995), was dazu führte, daß dieser Antikörper derzeit in zwei großen Studien eingesetzt und untersucht wird (NB97 und HR-NBL-1).

Eine Erweiterung der antitumoralen Wirksamkeit von CH14.18 gelang durch die gentechnische Kopplung mit Zytokinmolekülen, beispielsweise IL-2. Hierbei macht man sich sowohl die natürlichen Effektormechanismen eines spezifischen Antikörpers als auch die immunstimulatorischen Eigenschaften eines Zytokins zunutze, Effektorzellen des Immunsystems, wie T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen etc., in das Tumormilieu zu locken. Die gekoppelte Induktion einer solchen aktiven und passiven Immunisierung konnte bereits in mehreren Tiermodellen nachgewiesen werden (Lode *et al.* 1997b), (Lode *et al.* 1998).

Es ergab sich allerdings, daß IL-2 als Zytokinanteil beim Neuroblastom weniger zur Induktion eines immunologischen Gedächtnis, eine durch CD8⁺T-Zellen vermittelte Eigenschaft, beitrug, als vielmehr eine Induktion einer durch NK-Zellen vermittelten Immunantwort nach sich zog (Lode *et al.* 1998). Im Gegensatz zu IL-2 konnte eine gesteigerte Infiltration mit CD8⁺T-Zellen in den Tumor im *in vivo*-Modell durch den Einsatz von IL-12 erreicht werden (Lode *et al.* 1999), (Pertl *et al.* 2001). Allerdings werden für eine effektive, antitumorale zytolytische T-Zell-Antwort CD8⁺T-Zellen benötigt, die spezifisch Antigene auf den Neuroblastomzellen erkennen. Hier kam nun eine neue Strategie ins Spiel: der Einsatz von für tumorassoziierte Antigene kodierenden DNA-Vakzinen. Diese Form der aktiven Immunisierung sollte die Induktion einer zellulären Immunantwort mit sich bringen.

1.2. DNA-Vakzine und Applikationsmöglichkeiten

Die Entwicklung von DNA-Vakzinen basiert auf der Erkenntnis aus den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts, daß eine Immunisierung mit „nackter“ DNA zu langlebigen und starken Zell-vermittelten wie auch humoralen Immunantworten führt (Montgomery *et al.* 1993), (Fynan *et al.* 1993), (Corr *et al.* 1996), (Casares *et al.* 1997). Die Tatsache, daß professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC's) am besten zur Antigenprozessierung und –präsentation geeignet sind, führte zur Weiterentwicklung dieser Methode dahingehend, dendritische Zellen mit auf Antigen-DNA basierenden Vakzinen zu transfizieren und sie dem Wirtsorganismus als Impfstoff zu verabreichen (Tuting *et al.* 1997), (Yang *et al.* 1999).

Eine zusätzliche Effektivitätssteigerung der Immunantwort brachte schließlich die orale Applikation von DNA-Impfstoffen in attenuierten Bakterien, die allein durch ihre „Fremdartigkeit“ eine gesteigerte Immunreaktion mit sich bringen und ferner als Vehikel für

den Impfstoff dienen (Sizemore *et al.* 1997), (Paglia *et al.* 1998). Bewährt haben sich hierbei attenuierte *Salmonella typhimurium*-Stämme (Darji *et al.* 1997), (Catic *et al.* 1999), die bereits erfolgreich *in vivo* in unseren Arbeiten eingesetzt wurden, hier unter Verwendung des Stammes SL7207 (Lode *et al.* 2000), (Huebener *et al.* 2003). Die folgende Graphik soll verdeutlichen, wie eine orale Immunisierung unter Zuhilfenahme von SL7207 als Vehikel für ein DNA-Vakzin abläuft (Abb. 1).

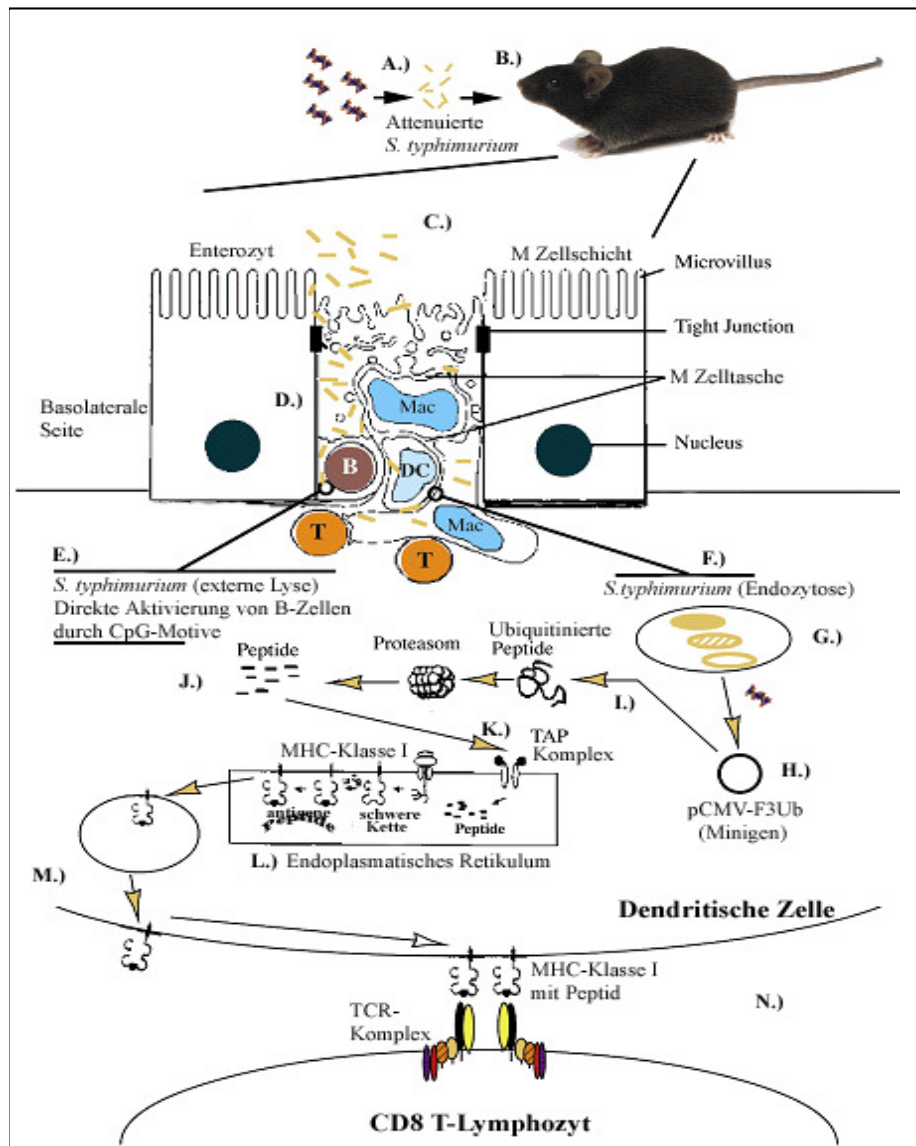


Abb. 1: Orale Immunisierung mit DNA-Impfstoffen *in vivo*

Für ein DNA-Vakzin kodierende Plasmid-DNA wird mittels Elektroporation in Bakterien des attenuierten Stammes *Salmonella typhimurium* SL7207 gebracht (A.). Die transformierten Salmonellen werden Mäusen oral verabreicht (B.), wo sie im Gastrointestinal-Trakt die Darmmukosa penetrieren und über die M-Zell-Schicht in die Peyer'schen Plaques gelangen (C.). Hier findet zum einen eine direkte, externe, durch B-Zellen und Komplementsystem verursachte Lyse der Bakterien statt (E.) Zum anderen werden die attenuierten Salmonellen durch vor Ort lokalisierte Antigen-präsentierende Zellen (APC's) mitsamt des zuvor inserierten DNA-Impfstoffs phagozytiert (D.). Die Attenuierung der *S. typhimurium*-Bakterien beruht auf einer Mutation im *Aro*-Gen (*Aro*-), welche einen kompletten Funktionsverlust dieses Gens zur Folge hat. Infolgedessen kommt der Metabolismus aromatischer Aminosäuren in den Bakterien zum Erliegen, was wiederum dazu führt, daß die SL7207 *in vivo* nach zwei Generationen absterben. Nach dem Absterben der Salmonellen (G.) (aufgrund ihres Gendefekts oder nach Lyse durch die APCs) verbleibt die Plasmid-DNA (H.) in der APC und wird translatiert (I.). Die entstandenen Vakzin-Proteine/Peptide werden über den proteasomalen Degradationsweg abgebaut (J.), die AG-

Peptidfragmente mit einer Länge von 8-10 AS ins ER transportiert (K.) und dort an MHC-Klasse-I-Moleküle gekoppelt (L.). Die MHC-Klasse-I/Peptid-Komplexe werden nun über den Golgi-Apparat an die Oberfläche transportiert (M.) und dort CD8⁺T-Zellen präsentiert (N.).

Neben dem Applikationssystem ist das verwendete Vektorsystem für einen effektiven Einsatz eines DNA-Vakzins von ausschlaggebender Bedeutung. Das Hauptziel bei der oben beschriebenen Impfstrategie besteht darin, Antigen-Peptide in MHC-Klasse-I-Komplexen an der Oberfläche einer APC zu exprimieren. Also sollte der proteasomale Abbau des Vakzin-Proteins/Peptids möglichst effektiv ablaufen, da die proteasomale Degradation überwiegend für die Herstellung antigener Peptide mit einer Länge von 8-10 AS Länge, die für eine anschließende Bindung an MHC-Klasse-I im ER geeignet sind, verantwortlich ist (Übersicht in (Kloetzel 2001)). Ein Schlüsselement stellt hierbei das Ubiquitin (Ub) dar.

1.3. Ubiquitin und das Proteasom

Das Ub ist ein 76 AS langes, hochkonserviertes Protein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. So differiert humanes Ub beispielsweise nur um drei AS von dem der Hefe. Die Hauptfunktion in der Zelle besteht darin, defekte oder nicht mehr benötigte Proteine durch kovalente Bindung der C-terminalen Carboxygruppe des Ub an die Aminogruppe eines Lysin-Restes des Zielproteins zum Abbau zu markieren. Eine Ubiquitinierung führt im folgenden zu einer Polyubiquitinierung durch Anhängen weiterer Ub-Moleküle an das erste Ub: hierbei scheint der Lysin-Rest in Position 48 (Lys₄₈) die für einen proteasomalen Abbau notwendige Stelle zu sein, an die sich weitere Ub-Moleküle über eine Isopeptidbindung an das jeweils bereits gebundene Ub anlagern (Laney & Hochstrasser 1999).

Das polyubiquitinierte Protein wird weiter zum 26S-Proteasom (s. Abb. 2) geleitet und dort von der 19S- regulatorischen Untereinheit (UE), dem *regulatory particle* (RP), erkannt. Der 19S-RP lässt sich dabei in zwei Substrukturen unterteilen: dem als *base* bezeichneten, aus 8 UE bestehenden Teil, der sich an die flankierenden Enden des 20S-*core particle* (CP) anlagert, und von dem sechs UE über eine ATPase-Aktivität verfügen und einem als *lid* bezeichneten, ebenfalls aus acht UE bestehenden Teil, der jedoch keine ATPase-Aktivität aufweist und dessen Funktion noch ungeklärt ist. Den katalytisch aktiven UE im *base*-19S-RP wird dagegen die Aufgabe der Entfaltung des Zielproteins und dessen Einschleusung in den 20S-CP des Proteasoms zugeschrieben (Glickman *et al.* 1998), (Braun *et al.* 1999).

Der 20S-CP des eukaryotischen Proteasoms besteht aus 28 UE (14 unterschiedliche Paare), die in vier Ringen zu je sieben UE aufeinander gestapelt sind (s. Abb. 2). Dabei werden die beiden äußeren Heptamer-Ringe aus den α -UE gebildet (α_1 - α_7), während die zwei inneren Ringe aus je sieben β -UE bestehen (β_1 - β_7). Die eigentliche proteolytische Aktivität wird jeweils von den UE β_1 , β_2 und β_5 vermittelt (Groll *et al.* 1997).

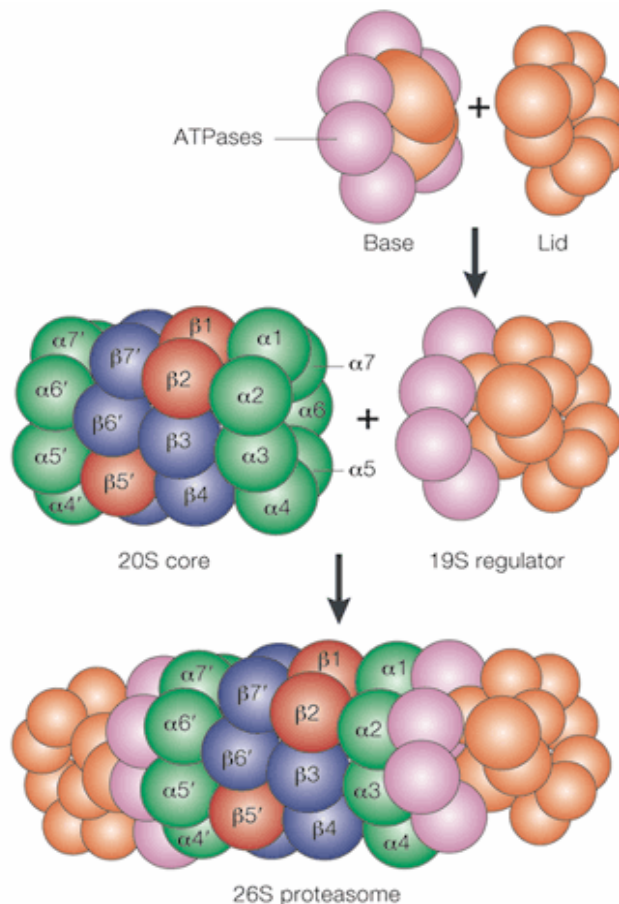


Abb. 2: Das eukaryotische 26S-Proteasom (aus Klotzel, PM, Nat.Rev.Mol.Cell Biol.,(Klotzel 2001))

In dieser Abbildung ist der Aufbau der 28 UE des 26S-Proteasoms dargestellt. **A.** Die zwei Sub-UE (*base* und *lid*) des 19S-RP mit den sechs ATPase-UE (rosa). **B.** Der 20S-CP, gebildet aus vier aufeinander gestapelten Heptamer-Ringen, bestehend aus je zwei α -Ringen (α_1 - α_7 , grün) und zwei innen liegenden β -Ringen (β_1 - β_7 , blau), wobei die proteolytisch aktiven UE β_1 , β_2 und β_5 rot dargestellt sind. **C.** Das 26S-Proteasom.

Das in Abb. 2 dargestellte 26S-Proteasom ist in dieser Form zu jeder Zeit in einer eukaryotischen Zelle aktiv. Die von den zuvor polyubiquitinierten Proteinen stammenden Bruchstücke, die nach der Degradation das Proteasom verlassen, haben eine Länge von 3 bis 25 AS und werden danach unter normalen Bedingungen zum allergrößten Teil hydrolysiert und so dem Aminosäure (AS)-Pool der Zelle zugeführt (Kisselev *et al.* 1999). Genau

genommen ist die Bildung und anschließende Präsentation eines antigenen Peptids sogar ein sehr ineffizienter Prozeß: es müssen unter Umständen bis zu 100 (für hochaffine MHC-Klasse-I-Antigene) oder sogar bis zu 10000 Peptide (für Peptide mit geringer Affinität zu MHC-Klasse I) vom Proteasom gebildet werden, um ein Antigen-Peptid schließlich an der Zelloberfläche in MHC-Klasse-I zu präsentieren (Fruci *et al.* 2003). Es stellt sich natürlich die Frage, wie es das Immunsystem der Vertebraten schafft, einen solch ineffizienten Vorgang in der Zelle zu seinen Gunsten, nämlich zu einer effektiven Präsentation von Antigen-Peptiden, zu modifizieren.

Hier kommen nun Immunmodulatoren wie das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) ins Spiel, welches von Natürlichen Killer (NK)-Zellen, aktivierten T-Helfer-Lymphozyten und zytotoxischen CD8⁺T-Zellen gebildet wird, also durchaus unter Bedingungen, in denen das Immunsystem aktiv ist. IFN- γ induziert eine Heraufregulation der Gene, die für eine effiziente CD8⁺T-Zell-vermittelte Immunantwort benötigt werden: hierzu gehören Gene, die für die Bildung der TAP-Proteine und die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls verantwortlich sind. Außerdem wird die Translation bestimmter UE des 20S-Proteasoms und des Proteasom-Aktivators PA28 induziert (York *et al.* 1999). PA28, auch bekannt als 11S-Regulator, besteht aus zwei IFN- γ -induzierbaren UE (PA28 α und PA28 β) und bindet an die außen lokalisierten α -Ringe des 20S-Proteasoms (Whitby *et al.* 2000). Daß PA28 eine wichtige regulatorische Funktion bei der Antigenprozessierung durch das Immunoproteasom hat, ist unbestritten; die genaue Funktion ist zur Zeit jedoch ungeklärt. Bisherige Daten lassen allerdings vermuten, daß PA28 beispielsweise einen stimulierenden Effekt auf die Bildung bestimmter T-Zell-Epitope ausübt (van Hall *et al.* 2000) und für eine effizientere Aufnahme von Peptid-Substraten in den 20S CP bzw. für ein effizienteres Ausschleusen von Peptidfragmenten aus dem 20S-CP verantwortlich ist (Stohwasser *et al.* 2000), (Kohler *et al.* 2001).

Im Patienten bzw. *in vivo* kann jedoch das beste Applikations- und Vektorsystem keine effektive Impfung vermitteln, wenn das DNA-Vakzin für ein ungeeignetes Antigen kodiert. Hier stellte sich nun die Frage nach einem tumorspezifischen bzw. tumorassoziierten Antigen, welches für die Konstruktion eines DNA-Impfstoffes speziell gegen das Neuroblastom geeignet ist.

1.4. Die Tyrosinhydroxylase

Neben der Expression von GD₂ ist die erhöhte Produktion von Katecholaminen in Neuroblastomzellen ein wichtiges, tumorassoziiertes Charakteristikum, was auch bei der Diagnosestellung und zur Beurteilung des Therapieverlaufs von NB-Patienten zur Anwendung kommt. Hierbei spielt das Schrittmacherenzym der Katecholaminbiosynthese, die Tyrosinhydroxylase (TH), eine wichtige Rolle als klinischer Marker (Miyajima *et al.* 1995), (Lode *et al.* 1997a), (Pession *et al.* 2003). Die TH, auch Tyrosin-3-Monooxygenase (EC 1.14.16.2) genannt, katalysiert die Umwandlung von L-Tyrosin zu DOPA, aus dem die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin gebildet werden, s. Abb. 3.

Die humane TH (hTH) weist eine Länge von 528 AS auf und ist erst in tetramerer Form aktiv, wobei jede UE ein Molekulargewicht von 58.5 kDa besitzt. Das murine Homolog ist mit 497 AS Länge etwas kürzer, hier hat ein Monomer ein Molekulargewicht von 55.9 kDa. Dennoch ist die Proteinsequenz hochkonserviert: es besteht eine 82.6%ige Identität zwischen der humanen und der murinen Form dieses Enzyms (Alignmentprogramm Laligne, (Huang & Miller 2004)).

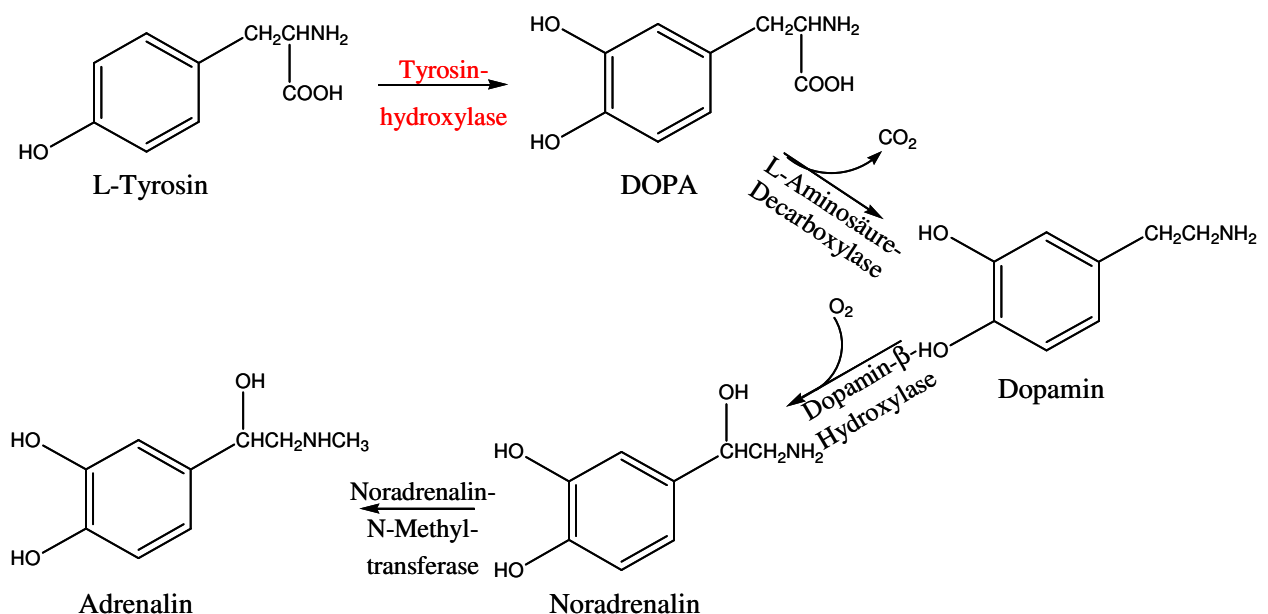


Abb. 3: Katecholaminbiosynthese

Analog zur Tyrosinase, die als Schrittmacherenzym der Melaninbiosynthese ein etabliertes T-Zell-Antigen im Melanom darstellt, wurde die TH als Ausgangspunkt für die Konstruktion eines DNA-Impfstoffes für das Neuroblastom verwendet. Bereits die gesamte kodierende Sequenz der murinen TH (mTH) deutete eine Wirksamkeit im Mausmodell an (Lode *et al.* 2000). Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob ein DNA-Impfstoff, der nur für aus der Gesamtsequenz der mTH stammende potentielle MHC-Klasse-I-Peptide kodiert, eine ebenso effektive oder sogar verbesserte Immunantwort gegen das Neuroblastom *in vivo* induzieren kann (s. dazu Abschnitt 1.7.). Für die Auswahl stark antigenen Peptide aus der mTH-Sequenz wurde ein T-Zell-Epitop-Vorhersageprogramm verwendet, da in MHC-Klasse-I-Komplexen der verwendeten murinen Neuroblastomzelllinie keine der mTH-Sequenz entstammenden Peptide nachgewiesen werden konnten.

Die rein putativ gewählten Peptide sollten auf ihre Wirksamkeit als DNA-Impfstoff hin untersucht werden und somit die Möglichkeit eröffnen, ein sehr kurzes DNA-Vakzin, im Vergleich zur gesamten kodierenden Sequenz eines tumorassoziierten Antigens, auf rein hypothetischer Basis herzustellen. Zum Vergleich sollte ein analog aufgebauter DNA-Impfstoff eingesetzt werden, der jedoch für Peptide kodiert, die in MHC-Klasse-I-Komplexen auf der verwendeten Neuroblastomzelllinie exprimiert werden. Die Herstellung eines solchen, zuletzt genannten Impfstoffes beinhaltet allerdings die vorherige Identifikation der antigenen Peptide auf den jeweiligen Krebszellen. Im Gegensatz dazu erlaubt die Methode, vorhergesagte CD8⁺ T-Zell-Epitope aus der Sequenz eines tumorassoziierten Antigens als DNA-Impfstoff einzusetzen, eine wesentlich schnellere und billigere Herstellung und ist zudem auf andere Krebsarten übertragbar, sofern es ein geeignetes Tumorantigen gibt. Um letztlich über die Effektivität eines T-Zell-Epitop-Vorhersageprogramms Aussagen machen zu können, wurde ein drittes DNA-Vakzin verwendet, welches auch für Peptide aus der Gesamtsequenz der mTH kodiert, die allerdings laut Vorhersage keine oder nur sehr schwache CD8⁺ T-Zell-Epitope darstellen.

1.5. Der eukaryotische Expressionsvektor pCMV-F3Ub

Die in der vorliegenden Arbeit konstruierten DNA-Minigene wurden alle in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-F3Ub (bereitgestellt von JL Whitton, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA), der eine Amp-Resistenz vermittelt, s. Abb. 4, subkloniert.

Dieser Vektor ermöglicht es, ein ubiquitiniertes Fusionspeptid zu exprimieren, indem DNA-Fragmente unmittelbar stromabwärts eines Ub-Gens inseriert werden. Damit die Ubiquitinierung möglichst stabil ist, haben Rodriguez *et al.* die C-terminale Aminosäure Gly₇₆ mittels einer Punktmutation zu Ala₇₆ geändert (Rodriguez *et al.* 1997) und das mutierte Ub-Gen über eine *NotI*-Schnittstelle in das pCMV-Plasmid kloniert, welches durch Exzision eines β -Galaktosidase-Gens aus dem ursprünglichen Plasmid pCMV- β entstand (Firma Clontech). Ub bindet normalerweise über die C-terminale AS Gly₇₆ kovalent an einen Lys-Rest des Zielproteins. Ein zweites Ub heftet sich wiederum an einen Lys-Rest des ersten Ub-Moleküls usw.; es entsteht ein polyubiquitiniertes Peptid/Protein (s. Abschnitt 1.3.). Dies ist gemeinhin ein Abbausignal für das betreffende Protein durch das Proteasom, wobei dann parallel zur Degradation des Zielproteins ein Proteasekomplex die Poly-Ub-Kette nach jedem Gly₇₆ schneidet und somit freie Ub-Monomere entlässt (*recycling*). Aufgrund dieser Tatsache sollte eine C-terminale Mutation im Ub-Gen von Gly₇₆ zu Ala₇₆ eine Stabilisierung der Fusion von Ub und Zielprotein hervorrufen, mit dem Ziel, ihm eine längere Halbwertszeit zu verschaffen und somit den proteasomalen Abbau und die Bildung bestimmter, aus dem Zielprotein stammender MHC-Klasse-I-Liganden zu maximieren. Hier dient das Ub im Fusionsprotein als Substrat zur Polyubiquitinierung, um bei der Abwesenheit von Lys-Resten in artifiziellen Minigenvakzinen den proteasomalen Abbau zu gewährleisten. Bereits im Jahr 1989 konnten Ecker *et al.* in der Hefe zeigen, daß sich die Abbaurate eines Ub-Fusionsproteins durch die C-terminale Mutation von Gly₇₆ zu Ala₇₆ um $\geq 90\%$ verringern lässt, ohne daß sie dabei einen negativen Einfluss auf eine Polyubiquitinierung ausübt (Ecker *et al.* 1989).

Das zu fusionierende Protein/Peptid wird über eine einzigartige *BglIII*-Schnittstelle direkt stromabwärts des Leserahmens für das Ub-Gen in den pCMV-F3Ub-Vektor kloniert. Der Einbau über eine einzige Schnittstelle führt natürlich dazu, daß sich das einzuklonierende DNA-Fragment in zwei verschiedenen Richtungen in den Vektor integrieren kann. Um nach der Klonierung zu überprüfen, ob der Einbau korrekt ist, macht man sich eine *EcoRI*-Schnittstelle unmittelbar upstream des CMV-Promotors im pCMV-F3Ub-Plasmid zunutze, welche nach einem *EcoRI*-Verdau zusammen mit der durch das Minigen-Design eingeführten zweiten *EcoRI*-Schnittstelle am 3'-Ende des zu inserierenden Minigens zu einem ca. 1100 bp großen (bei „falschem“ Einbau) oder zu einem ca. 1260 bp-großen Fragment (bei „korrektem“ Einbau) führt; 1100 bp (Vektorteilstück) + 162 bp (Minigen), s. Abb. 4.

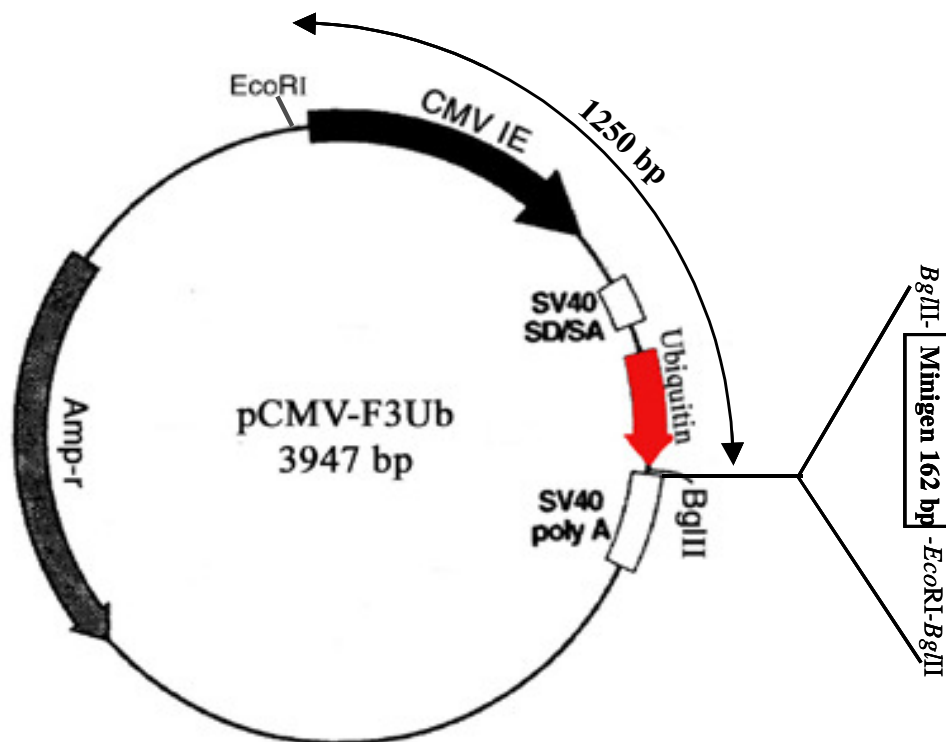


Abb. 4: Der eukaryotische Expressionsvektor pCMV-F3Ub mit Einbauort für die Minigene

Die Graphik zeigt den pCMV-F3Ub-Vektor mit der Klonierungsschnittstelle *Bgl*II, die den Einbau eines DNA-Fragments (hier mit „Minigen“ bezeichnet) ermöglicht, und somit die Expression eines Ub-Fusionsproteins nach sich zieht. Das Ub-Gen ist rot markiert. Die für die Überprüfung des korrekten Einbaus des inserierten DNA-Fragments wichtige *Eco*RI-Schnittstelle befindet sich ca. 1250 bp upstream der *Bgl*II-Schnittstelle. Rechter Teil der Graphik: Die Minigen-DNA-Sequenz wird von Restriktionsschnittstellen für *Bgl*II flankiert, eine zusätzliche *Eco*RI-Schnittstelle befindet sich am 3'-Ende unmittelbar vor der *Bgl*II-Schnittstelle.

1.6. Auswahl der in dieser Arbeit eingesetzten Antigene

Es wurden drei verschiedene Minigene konzipiert, die für verschiedene Antigene kodieren. Diese sind mit den verwendeten Peptidsequenzen und den errechneten Bindungsaffinitäten an MHC-Klasse-I in Tab. 1 aufgelistet und werden im folgenden einzeln behandelt.

Tab. 1: MHC Klasse-I-Liganden, welche den in dieser Arbeit hergestellten Minigenen zugrunde liegen.

Name des Minigens	AS-Sequenz	Länge [AS]	Zugrunde liegendes Protein (BLAST, SIB)	score in <i>syfpeithi</i>
<i>Ersatzepis</i>	TEALPVKLI	9	Ribonukleosid-diphosphat Reduktase M2 Kette, <i>Mus musculus</i> (<i>Rrm2</i>)	27
	NEYIMSLI	8	div. Übereinstimmungen zu Proteinen aus der Familie der Phosphatase 2A Regulatoren. Untereinheit B, <i>Mus musculus</i>	22
	FEMVSTLI	8	1. 2310034L04Rik Protein, isoliert aus Mammakarzinom von FVB/N-Maus; nicht näher charakterisiert 2. Hypothetisches Protein, isoliert aus Inselzellen des Pankreas von C57BL/6L-Maus	26
<i>mTH3kepi</i>	FETFEAKI	8	Tyrosinhydroxylase aus <i>Mus musculus</i>	24
<i>s</i>	EERDGNV	8		22
	VEYTKEEI	8		21
<i>mTHlowest</i>	HHLETRPA	8	Tyrosinhydroxylase aus <i>Mus musculus</i>	3
	PRKVSELD	8		3
	QFSQDIGL	8		0

Das erste Minigen wurde als Positivkontrolle hergestellt. Es kodiert für drei Peptide, die aus MHC-Klasse-I-Peptidkomplexen von den im *in vivo*-Versuch verwendeten NXS2-Neuroblastomzellen isoliert werden konnten. Es erhielt den Namen *Ersatzepis*. Die Sequenzen und die Proteine, aus denen sie stammen, sofern es in BLAST-Analysen (Swiss Institute of Bioinformatics 2004) zu Übereinstimmungen kam, sind in Tab. 1.1 aufgelistet. Diese Peptidsequenzen lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor; die dazugehörigen Experimente wurden von Hans-Georg Rammensee und Claudia Lemmel (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das zweite Minigen wurde mit der genetischen Information für drei Peptide hergestellt, welche innerhalb der Gesamtsequenz der mTH die höchste vorhergesagte Bindungsaffinität an MHC-Klasse-I aufweisen (Name des Minigens *mTH3kepi*, s. Tab. 1.1). Hierzu wurde die

Gesamtproteinsequenz der mTH mit Hilfe der MHC-Liganden-Datenbank *syfpeithi* nach Sequenzen durchsucht, die mit hoher theoretischer Affinität an H2-K^k, dem MHC Klasse I-Allel der A/J-Maus, binden (Rammensee *et al.* 1999). In Tab. 2 sind die zehn potentiellen H2-K^k-Bindungsmotive aus der Gesamtproteinsequenz der mTH mit ihrer Position im Protein aufgelistet, welche die höchsten theoretischen Bindungsaffinitäten, sogenannte *scores*, zu diesen MHC Klasse I-Molekülen aufweisen. Die Errechnung der *scores* basiert auf veröffentlichten Motiven von natürlichen MHC-Liganden und berücksichtigt dabei, welche AS bevorzugt oder am häufigsten in den jeweiligen Positionen der Bindungsstelle im MHC-Molekül binden. Jede AS eines jeden Peptids erhält dabei einen bestimmten Wert, je nachdem wie häufig es in der jeweiligen Position bei natürlichen MHC-Liganden auftaucht. Der Wert ist umso höher, je besser die AS in diese Position passt; der Höchstwert hierbei beträgt 15 für eine ideale Bindung; AS, die nur sehr selten in einer Position auftauchen, erhalten den Wert 1. Eine AS kann auch einen Negativwert erhalten, wenn sie z.B. einen ungünstigen Effekt auf die Bindungsfähigkeit des Peptids ausübt; Werte für solche AS liegen dann zwischen -1 und -3. Je nachdem für welches MHC-Molekül man potentielle Liganden sucht, können dabei die *Maximalscores* unterschiedlich ausfallen. Um die erhaltenen Werte einschätzen zu können, sollte man also für das jeweilige Allel bekannte Liganden/Epitope mit in die Wertung einbeziehen. Im vorliegenden Fall des H2-K^k-Allels der A/J-Maus ergibt sich beispielsweise ein besonders hoher *score* von 28 für das Peptid FELTGNLI aus der Sequenz des Influenza HA2-Virus (Stryhn *et al.* 1996).

Das dritte Minigen wurde als Negativkontrolle konzipiert und zum Beweis der Verlässlichkeit von Vorhersagen geeigneter MHC-Klasse-I-Liganden verwendet. Zu diesem Zweck wurden aus der gesamten mTH-Sequenz analog zu den zwei anderen Minigenen drei Peptide ausgewählt, die eine sehr niedrige Bindungsaffinität zum MHC-Klasse-I-Allel der A/J-Maus aufweisen. Dieses Minigen wurde mit *mTHlowest* bezeichnet, s. Tab. 1.

Tab. 2: Die zehn potentiell hochaffinsten H2-K^k-Bindungsmotive aus der Gesamtproteinsequenz der mTH

Position	Sequenz	score nach <i>syfpeithi</i>	Länge [AS]
104	FETFEAKI	24	8
75	EERDGNV	22	8
74	FEERDGNV*	22	9
223	VEYTKEEI	21	8
228	EEIATWKEV	21	9
460	FDPYTLAI	20	8
362	EEIEKLSTV	20	9
129	LEYFVRFEV	19	9
174	LDKCHHLV	18	8
413	FDPDTAAV	17	8
424	QDQTYQPV	17	8
255	<i>FELTGNLI</i>	28	8

*Die grauunterlegte Peptidsequenz FEERDGNV entspricht bis auf die erste AS der darüber beschriebenen AS-Folge und wurde deshalb nicht beim Konstruieren eines Minigens berücksichtigt. Die **fett** markierten Peptidsequenzen wurden für das *mTH3kepis*-Minigen verwendet, s. auch Abb. 1.5. Die *kursiv* geschriebene Peptidsequenz stellt einen idealen H2-K^k-Liganden dar, sie stammt aus der Proteinsequenz des Influenza HA2-Virus.

1.7. Das Design der DNA-Minigen-Vakzine

Die Konstruktion aller drei Minigene folgte einem einheitlichen Design (Abb. 5). Zunächst wurden die einzelnen Peptide in jedem der Minigene durch ein *spacer*-Peptid verbunden, das mit großer Wahrscheinlichkeit eine Spaltung des Gesamtpeptids an dieser Stelle durch die Proteasom-Maschinerie provoziert. Das Peptid Ala-Ala-Tyr = AAY, wurde zu diesem Zweck ausgewählt (Holzhutter *et al.* 1999), (Velders *et al.* 2001). Desweiteren wurde *downstream* der Minigen-Peptide die Sequenz für einen Hämagglutinin (HA)-Tag (YPYDVPDYA) eingefügt, um die Expression der Peptide in einem Western-Blot nachweisen zu können.

Um die DNA-Fragmente nach der Sequenzierung in den finalen Expressionsvektor klonieren zu können, wurden verschiedene Schnittstellen eingefügt: *Bgl*III flankiert dabei das DNA-Fragment, da sich diese Schnittstelle als einzige im Endvektor pCMV-F3Ub an der Klonierungsstelle unmittelbar auf das Ub-Gen folgend befindet. Eine Überprüfung der Orientierung des Einbaus der DNA-Fragmente im pCMV-Vektor wird durch die Insertion einer *Eco*RI-Schnittstelle ermöglicht. Die AS- und DNA-Sequenzen der drei Minigene sind in Abb. 5 dargestellt.

Ersatzepis

Ersatzepis-sense (92bp):

5'-AGATCTTCGCCG**CCT**ACACCGAAGCCCTGCCCGTGAAGCTGATTGCCG**CCTA**
CAACGAATACATTATGAGCCTGATTGCTGCTTATTT**CG**-3'

Ersatzepis-antisense (96bp):

5'-AGATCTGAATTCCTAAGCGTAATCTGGGACATCGTAAGGGTAGTATGCTGCGA
TTAGGGTGCTCACCATTTCGAAATAAGCAGCAATCAGGCTCAT-3'

mTH3kepis

mTH3kepis-sense (93bp):

5'-AGATCTTCGCCG**CCT**ACTTCGAAACCTTCGAAGCCAAGATCGCTGCCTATGA
AGAACGTGATGGCAACGCCGTGGCGGCTTATGTGGAATACA-3'

mTH3kepis-antisense (89bp):

5'-AGATCTGAATTCCTAAGCGTAATCTGGGACATCGTAAGGGTAATATGCGGCGA
TTTCTTCCTTGGTGTATTCCACATAAGCCGCCACGG-3'

mTHlowest

mTHlowest-sense (93bp):

5'-AGATCTTCGCTGCCTACCACCACCTGGAAACCCGTCCCGCTGCCG**CCT**ATCC
GCGTAAGGTGAGCGAACTGGATGCTGCGTACCAGTTCAGCC-3'

mTHlowest-antisense (89bp):

5'-AGATCTGAATTCCTAGGCGTAATCGGGCACATCGTAGGGGTAAATAAGCGGCC
AGGCCAATATCTTGGCTGAACTGGTACGCAGCATCCA-3'

Abb. 5: Die in dieser Arbeit hergestellten Minigene.

Kursiv: Restriktionsschnittstellen; **fett**, **Großbuchstaben**: *spacer*-Peptid; **Stop**: Ende der Translation; **rot**: H2-K^k-Epitope; **blau**: HA-Tag

1.8. Selbstantigene und selbstreaktive T-Zellen

Die in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Vakzine kodieren für Peptide, die auf Tumorzellen, in diesem Fall dem Neuroblastom, exprimiert werden. Da Neuroblastomzellen körpereigenen Zellen entstammen, stellen die an ihrer Oberfläche präsentierten Moleküle Selbstantigene dar, die mit einem Immunsystem in Wechselwirkung treten, das mit Einschränkungen selbst-tolerant ist. Es gibt allerdings Mechanismen, wie T-Zellen der negativen Selektion im Thymus entkommen können und somit selbstreaktiv sind. Dieser Vorgang wird nachfolgend kurz erläutert.

Die aus dem Knochenmark (KM) stammenden unreifen T-Vorläuferzellen durchlaufen im Thymus zwei wesentliche Reifungsschritte, die mit „positiver“ und „negativer“ Selektion

bezeichnet werden, und die mit der Ausbildung charakteristischer Oberflächenmarker einhergehen, wie dem T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex (also CD3 und α - und β -Kette des TCR) und den Ko-Rezeptoren CD4 bzw. CD8. Nur ca. 2-4% der pro Tag aus dem KM einwandernden T-Vorläuferzellen verlassen den Thymus als reife T-Zellen. Die meisten von ihnen werden dabei nach Ausbildung von CD4 und CD8 (doppelt-positiv) in die Apoptose geleitet, weil ihr T-Zell-Rezeptor Selbst-MHC-Moleküle nicht erkennt. Diese sogenannte positive Selektion findet im Thymus-Cortex statt.

Der Rest der doppelt-positiven T-Zellen trifft nun während seiner Wanderung in und durch die Medulla des Thymus auf dort ansässige dendritische Zellen und Makrophagen, die Komplexe aus Selbst-MHC/Selbst-Antigen exprimieren. Kommt es zu einer Erkennung dieser Komplexe durch die $CD4^+CD8^+$ T-Zellen und deren TCR, werden auch diese selbstreaktiven Immunzellen in die Apoptose geleitet. Dieser Prozeß der negativen Selektion ist die Grundlage für ein funktionierendes, selbst-tolerantes Immunsystem. Während und nach der negativen Selektion findet auch das letztendliche *priming* der T-Zellen statt, in dem sich entscheidet, welcher Ko-Rezeptor, CD4 oder CD8, weiterhin exprimiert wird, und ob eine reife T-Zelle demnach später zu einer Helfer- ($CD4^+$) oder einer zytotoxischen ($CD8^+$) T-Zelle werden kann. Die genauen Mechanismen, welche die einseitige Expression der Co-Rezeptoren induzieren, sind nach wie vor nicht genau geklärt. Eine wichtige regulierende Rolle wird dabei der Dauer und Intensität des Signals zugeschrieben, das über den TCR-Komplex während der negativen Selektion an die doppelt-positive T-Zelle weitergegeben wird (Yasutomo *et al.* 2000), (Watanabe *et al.* 2000). Der Großteil der reifen, naiven T-Zellen, die nach der Reifung den Thymus verlassen und in die Peripherie wandern, ist selbst-tolerant. Es gibt jedoch bestimmte Bedingungen, unter denen es einigen wenigen selbstreaktiven T-Zellen gelingt, der negativen Selektion zu entgehen. So erhalten beispielsweise T-Zellen, deren TCR-Komplex eine sehr geringe Bindungs-Avidität zu einem im Thymus präsentierten Selbst-MHC/Selbst-Peptid-Komplex aufweist, kein ausreichend starkes Apoptosesignal. Diese T-Zellen reihen sich nun in den Pool der reifen, naiven T-Zell-Population ein, bleiben kompetent und können aktiviert werden, wenn sie auf APCs treffen, die den für sie spezifischen MHC/Selbst-Peptid-Komplex in einer ausreichenden Dichte exprimieren. T-Zellen, deren TCR-Komplex Selbst-Antigene erkennt, die nicht oder in nur sehr geringem Maße im Thymus präsentiert werden, können ebenfalls der negativen Selektion entgehen. Zu diesen Selbst-Antigenen zählen beispielsweise Proteine, die nur in

einzelnen peripheren Geweben (wie z.B. dem Hoden) oder in bestimmten Entwicklungsstadien des Organismus exprimiert werden (Sandberg *et al.* 2000).

Das Ziel eines Anti-Krebs-Vakzins kann es also nur sein, peripher tolerante, autoreaktive T-Zellen effizient zu aktivieren, die zuvor der negativen Selektion im Thymus entkommen sind.

1.9. Das NXS2-Maus-Modell

Die Untersuchung von Wirksamkeit und Mechanismus der in dieser Arbeit hergestellten DNA-Vakzine erfordert den Einsatz in einem syngenem *in vivo* Neuroblastom-Modell, das idealerweise zur Ausbildung eines Primärtumors und zur Metastasenbildung in einem immunkompetenten Wirt führt. So ein Modell wurde vor wenigen Jahren mit der Herstellung der murinen Zelllinie NXS2 möglich.

Diese Zelllinie entstand ursprünglich mit dem Hintergrund, eine das Gangliosid GD₂-exprimierende Neuroblastom-Zelllinie herzustellen. Dafür wurde eine Hybride aus murinen, GD₂-negativen C1300-Neuroblastomzellen, die von A/J-Mäusen abstammen, und GD₂-positiven Grenzstrang-Ganglionzellen der Maus hergestellt. Durch Selektion von Zellen mit hoher GD₂-Expression wurde dabei letztlich die neue Zelllinie NXS2 mit heterogener, aber stabiler Expression von GD₂ etabliert (Lode *et al.* 1997b). Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Expression des Tyrosinhydroxylase-Gens, welche vergleichbar ist mit der humanen Neuroblastomzellen. Die Besonderheit des NXS2-Tumormodells ist die nach subkutaner und intravenöser Injektion von NXS2-Zellen spontane und experimentelle Metastasierung an Orten, die typisch für das menschliche Neuroblastom sind, wie Befall des Knochenmarks, Ausbreitung in die Leber, die Lymphknoten, die Nebennieren und die Ovarien. Eine weitere für die Durchführung dieser Arbeit wesentliche Eigenschaft dieses Modells ist der syngene Charakter, denn NXS2-Zellen wachsen in immunkompetenten A/J-Mäusen.

1.10. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, DNA-Vakzine auf Basis des tumorassoziierten Antigens Tyrosinhydroxylase auf ihre Effektivität hin zu untersuchen, *in vivo* eine aktive Immunisierung vermittelt durch CD8⁺T-Zellen gegen das schwach immunogene Neuroblastom zu induzieren. Das Durchbrechen der Selbsttoleranz sollte dabei mit Hilfe von attenuierten Salmonellen als Vakzin-Vehikel bewerkstelligt werden. Ferner sollte geklärt werden, ob die Verwendung weniger, aber hochaffiner CD8-T-Zell-Epitope aus der TH-Sequenz im Vakzindesign ausreicht, um spezifische zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. Für

das Vakzindesign sollte außerdem überprüft werden, ob die Kopplung der exprimierten Vakzinpeptide an Ubiquitin-Ala₇₆ Einfluß hat auf die Stärke der induzierten Immunantwort. Desweiteren sollte untersucht werden, ob eine Impfung mit Selbstantigenen die Ausbildung von Autoimmunphänomenen zur Folge hat, was für die spätere Anwendung am Menschen einen besonders wichtigen Aspekt darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und DNA-Vakzine sind zusammenfassend in Tab. 3 und 4 aufgeführt. Plasmide, die aus Klonierungszwischenschritten stammen, basieren auf dem pGEM[®]-T Easy-Vektor und sind aus Platzgründen hier nicht mit aufgelistet.

Tab. 3: Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Herkunft
Escherichia coli		
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>relA1, supE44</i> , (<i>lac-proAB</i>), [Φ , <i>traD36, proAB, lacI</i> q Z M15]	Promega, Wisconsin, USA
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q ZAM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, California, USA
Salmonella typhimurium		
SL7207	<i>S. typhimurium</i> 2337–65 derivativ <i>hisG</i> 46, DEL407 [<i>aroA::Tn10</i> {Tc-s}]	Dr. B. A. D. Stocker, Stanford, CA, USA

Tab. 4: Plasmide und DNA-Vakzine

Plasmid	Resistenz	Charakteristika	Herkunft
pCMV-F3Ub	Amp ^r	AS 76 im Ub-Gen ist A76 → stabilisierender Effekt für ubiquitiniertes Fusionspeptid (s. Abschnitt 2.3.4.)	(Rodriguez <i>et al.</i> 1997)
pCMV-F3Ub-WT	Amp ^r	Punktmutation im Ub-Gen von AS A76→ G76 = WT	diese Arbeit
<i>mTH3kepis</i> -pCMV	Amp ^r	CD8-T-Zellepitope aus mTH-Sequenz mit größter theoret. Bindungsaffinität an MHC-Klasse I im pCMV-F3Ub	diese Arbeit
<i>mTHlowest</i> -pCMV	Amp ^r	CD8-T-Zellepitope aus mTH-Sequenz mit geringster theoret. Bindungsaffinität an MHC-Klasse I im pCMV-F3Ub	diese Arbeit
<i>Ersatzepis</i> -pCMV	Amp ^r	CD8-T-Zellepitope isoliert aus MHC-Klasse I von NXS2-Zellen im pCMV-F3Ub	diese Arbeit
<i>mTH3kepis</i> -pCMV-WT	Amp ^r	CD8-T-Zellepitope aus TH-Sequenz mit größter theoret. Bindungsaffinität an MHC-Klasse I im pCMV-F3Ub-WT	diese Arbeit
<i>mTHlowest</i> -pCMV-WT	Amp ^r	CD8-T-Zellepitope aus mTH-Sequenz mit geringster theoret. Bindungsaffinität an MHC-Klasse I im	diese Arbeit

<i>Ersatzepis</i> -pCMV-WT	Amp ^r	pCMV-F3Ub-WT CD8-T-Zellepitope isoliert aus MHC-Klasse I von diese Arbeit NXS2-Zellen im pCMV-F3Ub-WT
----------------------------	------------------	---

2.2. Zelllinien

Alle verwendeten Medien und Zusätze wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von der Firma PAA Laboratories bezogen.

Im *in vivo*-Versuch wurde die aus der A/J-Maus stammende adhäre Neuroblastomzelllinie NXS2 eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM High Glucose mit 10% Mycoplex FBS und 1% Penicillin-Streptomycin bei 5% CO₂ bei 37°C. Beim Passagieren der Zellen wurden diese 5 min lang mit 0.05% Trypsin (Gibco) inkubiert, welches durch anschließende Gabe von frischem Medium inaktiviert wurde. Für die Tumorzellapplikation wurden die NXS2-Zellen in RPMI1640 ohne Zusätze aufgenommen.

Für die am Ende eines *in vivo*-Versuches anstehenden Zytotoxizitätsversuche wurden aus den Milzen der Mäuse Lymphozyten isoliert und in T-Zell-Medium (RPMI1640, 10% FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 100 IU/ml IL-2) *ex vivo* für 5-6 Tage kultiviert (s. Abschnitt 2.7.1.). Die Kultur erfolgte unter den gleichen atmosphärischen Bedingungen.

Die zum Nachweis von NK-Zell-Aktivität genutzte NK-sensitive murine Lymphomzelllinie YAC-1 (Kiessling *et al.* 1975a), (Kiessling *et al.* 1975b) wurden in RPMI1640 mit 10% Mycoplex FBS, 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert.

Für die Überexpression von hergestellten Plasmiden im eukaryotischen System wurde die adhäre Nierenzelllinie COS7 aus der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) genutzt, sie benötigte ebenfalls DMEM High Glucose mit 10% Mycoplex FBS und 1% Penicillin-Streptomycin.

Die Mamma-Karzinom-Zelllinie SCK stammt aus A/J-Mäusen und wurde als *target*-Zelle in einem Zytotoxizitätsassay eingesetzt. Diese adhäre Zelllinie wurde in RPMI1640 mit 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert; zum Passagieren der Zellen, mußten diese mit 0.5%igem Trypsin (Gibco) 3 min inkubiert werden, da das normal verwendete Trypsin (0.05%) keinen Effekt auf die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden hatte. Die SCK-Zelllinie wurde freundlicherweise von Chang W. Song, University of Minnesota, zur Verfügung gestellt.

Nur Zellen mit einer Kulturdauer von maximal 3 Monaten (etwa 20 Passagen) wurden für Versuche eingesetzt. Zur Lagerung wurden Zellen einer niedrigen Passagenummer (Passagen 3-7) in Einfriermedium (DMEM High Glucose, 10% Mycoplex FBS, 5% DMSO) aufgenommen und in mehreren Aliquots zusammen zunächst bei -80°C eingefroren. Zur

Lagerung wurden die bereits gefrorenen Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt. Alle 6 Monate erfolgte eine Überprüfung der Zellkulturen auf die Kontamination mit Mycoplasmen mittels Mycoplasma Detection Kit (Roche). Für die Zellkultur wurden 250ml-Kulturflaschen (FALCON, Becton-Dickinson) verwendet.

2.3. Molekulargenetische Arbeiten

Alle verwendeten Chemikalien für die PCR wurden von der Firma Promega bezogen, sofern nicht anders gekennzeichnet. Alle Enzyme sowie zugehörige Puffer und notwendige Zusätze stammen, sofern nicht anders gekennzeichnet, von der Firma New England Biolabs. Alle zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendeten Kits stammen von der Firma Machery+Nagel. Alle DNA-Leitern, die in der Gelelektrophorese eingesetzt wurden wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen.

2.3.1. Herstellung von DNA-Fragmenten mittels überlappender PCR (Polymerase Ketten-Reaktion)

Die Minigenkonstrukte zur Herstellung der DNA-Impfstoffe wurden mittels einer überlappenden PCR hergestellt. Hierbei wurden zwei ungefähr gleich lange Oligonukleotide, deren Sequenzen in einem Bereich von ca. 20-25 bp-Länge überlappen, d.h. zueinander komplementär sind, in einer PCR eingesetzt, um die jeweils anhängenden, einzelsträngigen Bereiche zu komplettieren und somit einen DNA-Doppelstrang herzustellen. In Abb. 6 ist das Prinzip dargestellt:

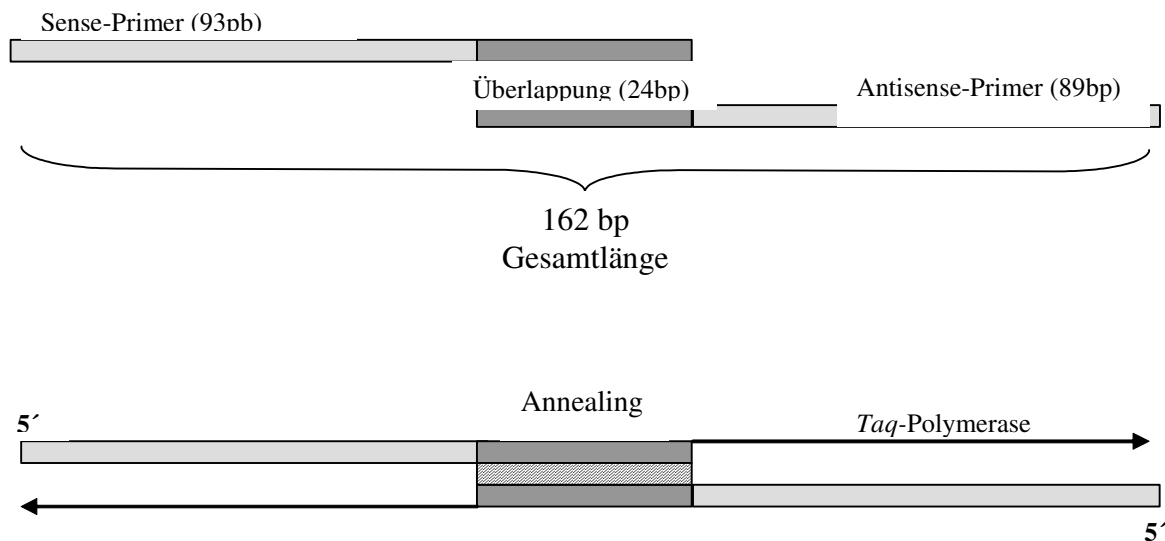


Abb. 6: Prinzip der überlappenden PCR

Für die in Abschnitt 1.7. beschriebenen DNA-Vakzine *Ersatzepis*, *mTH3kepis* und *mTHlowest* ergeben sich somit die folgenden Primer-Sequenzen, welche bei der Firma Invitrogen bezogen wurden:

Ersatzepis
 Ersatzepis-sense (92bp):
 5'-AGATCTTCGCGCGCTACACCGAAGCCCTGCCGTGAAGCTGATTGCGGCTTA
 CAACGAATACATTATGAGCGCTGATTGCTGCTTATTTGG-3'
 • Ersatzepis-antisense (96bp):
 5'-AGATCTGGAATTCCTAAGCGTAATCTGGGACATCGTAAGGGTAGTATGCTGCGA
 TTAGGGTGCTCACCATTTCGAAATAAGCGAGCAATCAGGCTCAT-3'

mTH3kepis
 mTH3kepis-sense (93bp):
 5'-AGATCTTCGCGCGCTACTTCGAAACCTTCGAAGCCAAGATCGCTGCTATGA
 AGAAGGTGATGGCAACGCGCTGGCGGCTTATGTGGAAATACA-3'
 mTH3kepis-antisense (89bp):
 5'-AGATCTGGAATTCCTAAGCGTAATCTGGGACATCGTAAGGGTAATATGCGGCGA
 TTCTCTCTTGGTGTATTCACATAAGCGCGGCAACGG-3'

mTHlowest
 mTHlowest-sense (93bp):
 5'-AGATCTTCGCTGGCTACCAACCTGGAAACCGTCCCGCTGCCGCTATCC
 GCGTAAGGTGAGCGAATGGATGCTGGCTACCAAGTTCAGCC-3'
 mTHlowest-antisense (89bp):
 5'-AGATCTGGAATTCCTAAGCGTAATCGGGACATCGTAGGGGTAATAAGCGGCGC
 AGGCCAATATCTTGGCTGAACCTGGTACCGAGCATCCA-3'

Abb. 7: Primersequenzen zur Herstellung der Minigen-DNA

Unterstrichene Basen: Überlappung mit jeweils dazugehörendem zweiten Primer; **fett**: Spacer-Peptid; *kursiv*: Restriktionsschnittstellen

2.3.2. PCR, Klonierung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten

Aus den lyophilisierten Primern wurde zunächst mit dest. H₂O eine 100 µM Stammlösung hergestellt, die bei -20°C gelagert wurde. Für die PCR wurde diese 1:10 verdünnt, so daß die Arbeitslösung eine Konzentration von 10 pmol/µl aufwies.

Zur Herstellung der DNA-Minigene wurde eine überlappende PCR mit den unter 2.3.2. aufgeführten Primer-Paaren nach folgendem Protokoll durchgeführt. Dabei wurden 6 verschiedene Annealing-Temperaturen (70°C, 65°C, 60°C, 55°C, 52°C, 50°C) in einem Gradientenprogramm (Mastercycler, Eppendorf) genutzt.

PCR-Programm:

92°C 2 min

92°C 15 s

60°C 30 s → Gradient +/- 5°C

72°C 1min 30s

Zyklen: 30

72°C 7 min

4°C ∞

Der 50 µl-Ansatz für eine solche PCR sah folgendermaßen aus:

5 µl sense-Primer

5 µl antisense-Primer

5 µl 10xPCR-Puffer

3 µl MgCl₂, 25mM

1 µl dNTP-Mix, 10mM each

30 µl dest. H₂O

1 µl Taq-Polymerase, 5u/µl

Die gesamten PCR-Ansätze wurden in einem 2%igen Agarosegel (Agarose NEEO, Roth), gelöst in 1xTAE-Puffer (50xTAE-Puffer: 2 M Tris-Acetate, pH 8.3, 50mM EDTA, beides Sigma-Aldrich) zusammen mit einer 50 bp- und einer 100 bp-Leiter (beide MBI Fermentas) aufgetragen. In Frage kommende Banden (also zwischen 150 und 200 bp) wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kit eluiert. Die Konzentration wurde bestimmt (Biophotometer, Eppendorf). Zur anschließenden Sequenzierung wurden rund 50 ng gereinigtes PCR-Fragment in den pGEM®-T Easy-Vektor (Promega) nach Herstellerangaben ligiert und chemokompetente *E.coli* JM109 mit der Hälfte des Ligationsansatzes mittels Hitzeschock (42°C) transformiert. Die *E.coli* wurden über Nacht bei 37°C auf Amp-LB-Platten mit X-Gal und IPTG (beides Promega) inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere weiße Kolonien gepickt und über Nacht in LB-Flüssigmedium (Gibco)

mit 100 mg/ml Amp (Sigma-Aldrich) kultiviert. Die Plasmide wurden mit Hilfe des NucleoSpin-Kits aufgereinigt und zur Kontrolle mit *EcoRI* verdaut. Der gesamte Verdau wurde zum Nachweis herausgeschnittener Fragmente in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Plasmide, die ein Insert in der erwarteten Länge enthielten, wurden zur Firma MWG-Biotech zur Sequenzierung geschickt, hierfür konnten die Sequenzierungsprimer M13-uni (-29) und M13 reverse (-29) eingesetzt werden.

Klone, die das korrekte Insert enthielten, wurden nochmals über Nacht bei 37°C in 3 ml LB-Flüssigmedium + Amp angezogen. 500 µl der Bakterienkultur wurden 1:1 mit 50%igem Glycerol versetzt und als Glycerol-Stock bei -80°C eingefroren.

Kontroll-Restriktion der pGEM-T Easy::Minigen-Plasmide für 1 h bei 37°C:

X µl Plasmid-DNA (0.5 µg)

2 µl 10x*EcoRI*-Puffer

0.5 µl *EcoRI* (20u/µl)

ad 20 µl dest. H₂O

2.3.3. Die Herstellung der DNA-Vakzine

Für die Subklonierung der Minigen-DNA-Fragmente in den Vektor pCMV-F3Ub mussten diese zunächst aus dem Sequenzierungsvektor pGEM-T Easy mittels eines *BglII*-Verdau für 2 h bei 37°C herausgeschnitten werden. Der gesamte Restriktionsansatz wurde danach in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die betreffende ca. 160 bp-große DNA-Bande aus dem Gel herausgeschnitten. Mit Hilfe des NucleoSpinExtract-Kits wurde das *BglII*-geschnittene Fragment anschließend aus dem Gel mit 30 µl dest. H₂O eluiert. Parallel dazu wurde der pCMV-F3Ub-Vektor ebenfalls mit *BglII* verdaut, wobei diesem Ansatz zusätzlich Alkalische Phosphatase beigelegt wurde, die die 5'-Phosphatreste von DNA (RNA, dNTP's) -Enden entfernt, um eine Re-Ligation der komplementären Vektorenden zu verhindern.

Restriktion des pGEM-T Easy::Minigen-Plasmids bei 37°C für 2 h:

X µl Plasmid-DNA (5 µg)

5 µl 10xPuffer 3

1.5 µl *Bgl*III (10 u/µl)

ad 50 µl dest. H₂O

Restriktion des pCMV-F3Ub-Vektors bei 37°C für 1.5 h:

X µl Vektor-DNA (3 µg)

3 µl 10xPuffer 3

1 µl *Bgl*III (10 u/µl)

1 µl *CIP* (Alkalische Phosphatase) (10 u/µl)

ad 30 µl dest. H₂O

Anschließend wurde das gereinigte *Bgl*III-geschnittene Minigen-DNA-Fragment in den *Bgl*III-geschnittenen pCMV-F3Ub-Vektor ligiert. Vor Zugabe der T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz für 5 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe der T4-DNA-Ligase wurde die Ligation bei 16°C über Nacht durchgeführt.

Ligation von *Bgl*III-*CIP*-pCMV-F3Ub mit *Bgl*III-Minigen-DNA:

X µl *Bgl*III-*CIP*-pCMV-F3Ub (50 ng)

X µl *Bgl*III-Minigen-DNA (150 ng)

2 µl 10xT4-DNA-Ligase-Puffer

1 µl T4-DNA-Ligase (3 u/µl)

ad 20 µl dest H₂O

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde dann mittels chemischer Transformation in *E.coli* JM109 transformiert. Hierzu wurde die DNA vorsichtig einem Aliquot von 50 µl JM109 auf Eis hinzugefügt und der Ansatz für 20 min ruhig auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C in einem nicht mehr sprudelnden Wasserbad, woraufhin die Bakterien für 2 min auf Eis abgekühlt wurden. Es wurden 350 µl SOC-Medium (Gibco) hinzugefügt und die Ansätze für 1 h bei 37°C geschüttelt. 100-200 µl des Ansatzes wurden dann auf bereits vorgewärmte LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten Kolonien gepickt (s. oben) und die DNA am darauffolgenden Tag

aus den gewachsenen Kulturen isoliert werden. Um einen korrekten Einbau der Fragmente nachzuweisen, wurde die DNA jeweils mit *Bgl*II bzw. *Eco*RI verdaut (Ansätze wie unter 2.3.2. beschrieben), die gesamten Restriktionsansätze wurden danach in einem 1.5%igen Agarosegel zusammen mit einer 50 bp, 100 bp- und 200 bp-Leiter aufgetrennt. Von den korrekten Klonen wurde jeweils einer ausgewählt und eine 100 ml-Bakterienkultur mit 100 mg/ml Amp angesetzt. Davon wurden am nächsten Tag zunächst Glycerol-Stocks angelegt, die bei -80°C gelagert werden, während aus der restlichen Kultur mit Hilfe des NucleoBond-Kits die Plasmid-DNA isoliert wurde. Diese konnte dann sowohl zur Transformation der attenuierten *Salmonella typhimurium* als auch in den folgenden *in vitro* Expressionsexperimenten eingesetzt werden.

2.3.4. Elektroporation von elektrokompetenten *Salmonella typhimurium* SL7207

Zur Herstellung der für die orale Applikation *in vivo* verwendeten DNA-Vakzin-tragenden Bakterien wurden attenuierte *Salmonella typhimurium* SL7207 mit den korrekten Minigen-Plasmiden (s. 2.1. Tab. 2.2) elektroporiert. Bei dieser Methode wird die DNA mit Hilfe eines elektrischen Impulses in die Bakterien „geschossen“.

Zunächst wurden Aliquots elektrokompetenter Salmonellen hergestellt. Dafür wurde eine Über-Nacht-Kultur ohne Selektionsdruck angezogen (3 ml). Diese wurde am nächste Morgen vollständig in 200 ml frisches LB-Flüssigmedium (Gibco) überführt und weitere 2-3 h bei 37°C kultiviert bis sich dicke Bakterienwolken beim Schwenken bildeten. Die Kultur wurde in vier vorgekühlte 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt, zentrifugiert (2°C , 4500 rpm) und der Überstand anschließend verworfen. Die Bakterienpellets wurden zweimal nacheinander in je 40 ml eiskaltem, sterilem dest. H_2O gelöst und wie vorher wieder pelletiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in etwas Restflüssigkeit (ca. 200 μl) gelöst, so daß eine dicke Bakteriensuspension entsteht. Diese wurde in Aliquots à 40 μl aufgeteilt, 1:1 mit 10%igem Glycerol (Sigma-Aldrich) versetzt und bei -80°C eingefroren bzw. zur Elektroporation eingesetzt.

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot der elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 400 ng Plasmid-DNA vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Das gesamte Aliquot wurde dann in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm-gap, Eppendorf) mit einer Spaltbreite von 2 mm überführt, in den Elektroporator (Multiporator, Eppendorf) eingesetzt und der Impuls gestartet (anliegende Spannung 2 kV, Impulsdauer 5 ms). Sofort nach der Elektroporation wurde die Küvette auf Eis 1 min gekühlt und

anschließend mit 600 µl vorgewärmten (37°C) SOC-Medium (Gibco) versetzt. Die Bakteriensuspension wurde in ein 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss daran wurden ca. 50 µl auf einer LB-Amp-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden ein paar Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Amp-Flüssigmedium wiederum über Nacht bei 37°C angezogen. Aus diesen Kulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert, zur Kontrolle mit *Bgl*II bzw. *Eco*RI verdaut (Restriktionsansatz wie unter 2.3.3. beschrieben) und im Agarosegel überprüft. Korrekte Klone wurden wiederum über Nacht angezogen und anschließend Glycerol-Stocks angelegt.

2.3.5. Gerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) zum Austausch einer Aminosäure

Um den Wildtyp pCMV-F3Ub-WT-Vektor wiederherzustellen, sollte die C-terminale AS Ala₇₆ wieder zurück zu Gly₇₆ mutiert werden. Für diese Mutation bedurfte es lediglich der Punktmutation eines Basenpaares im pCMV-F3Ub-Vektor, nämlich von 5'-GCA-3' zu 5'-GGA-3' (s. Abb. 8). Für diese sogenannte gerichtete Mutagenese wurde der QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet und nach Herstellerangaben angewendet. Das Prinzip hierbei besteht darin, mit Hilfe zweier Primer (sense und antisense, TIB Molbiol), die beide die gewünschte Mutation enthalten, und dem Ursprungsplasmid eine PCR durchzuführen, wobei ausgehend von den Primern die Einzelstränge des Template-Plasmids von einer DNA-Polymerase mit proof-reading Funktion, *Pfu*, vervollständigt werden. So entsteht das mutierte Plasmid. Die Original-Plasmid-DNA wird dann mit Hilfe der *Dpn*I-Endonuklease abgebaut; dies ist deshalb möglich, weil normalerweise jede aus *E.coli* isolierte Plasmid-DNA in dam-methyliertem Zustand vorliegt und somit angreifbar wird für die *Dpn*I-Endonuklease ist. Die nach diesem Schritt zurückbleibende mutierte pCMV-F3Ub-WT-DNA wird in superkompetente *E.coli* XL1-Blue transformiert. Die gewachsenen Kolonien werden kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert. Da sich im pCMV-F3Ub-Vektor keine Bindungssequenzen für herkömmliche Sequenzierprimer befinden, wurde zur Verifizierung der mutierten DNA-Sequenz das Ub-Gen in seiner Gesamtheit mittels *Not*I-Verdau aus den potentiell mutierten Klonen herausgeschnitten und in einen geeigneten Sequenzierungsvektor subkloniert. Nach Sequenzierung des Ub-Gens wurde ein Klon mit korrekter, mutierter leerer Plasmid-DNA ausgewählt und, wie unter Abschnitt 2.3.5. beschrieben, wieder in *Salmonella typhimurium* SL7207 überführt und als Glycerol-Stock eingefroren. Die einzelnen Minigen-DNA-Fragmente *Ersatzepis*, *mTH3kepis* und *mTHlowest*

wurden mittels eines Verdaus mit *Bgl*II aus den bereits hergestellten Minigen-tragenden pCMV-F3Ub-Plasmiden herausgeschnitten und anschließend in den mutierten, ebenfalls mit *Bgl*II und Alkalischer Phosphatase geschnittenen, pCMV-F3-Ub-WT-Vektor hineinligiert und zur Anzucht in *E.coli* JM109 transformiert. Die Restriktions-, Ligations- und Transformationsansätze wurden dabei wie unter 2.3.4. beschrieben angesetzt. Nach Überprüfung des korrekten Einbaus der Minigen-DNA, wie unter 2.3.4. beschrieben, wurden die korrekten Plasmid-DNA's in *Salmonella typhimurium* SL7207 transformiert und als Glycerol-Stock eingefroren.



Abb. 8: Rückmutation von Ala₇₆ zu Gly₇₆ im Ub-Gen des pCMV-F3Ub-Vektors

Dargestellt sind sowohl die Ub-Sequenz im pCMV-F3Ub-Vektor (oberer Teil) als auch die WT-Sequenz im pCMV-F3Ub-WT-Vektor (unterer Teil). Ebenfalls gezeigt wird die Insertionsschnittstelle *Bgl*II, in die die Minigen-DNA hineinligiert wird. *Kursiv*: Schnittstellen, **fett**: Startcodon, **rot**: Codon für AS₇₆ des Ub, oben: Ala₇₆, unten: Gly₇₆, unterstrichene Sequenz: Primer für gerichtete Mutagenese.

Primer für gerichtete Mutagenese:

Die Primer wurden den Herstellerangaben nach folgendem Prinzip ausgewählt: Die Länge sollte zwischen 25 und 45 bp betragen, und sie sollten eine Schmelztemperatur von $\geq 78^\circ\text{C}$ aufweisen. Desweiteren sollte die gewünschte Mutation (in der Sequenz unten rot markierte Base) in der Mitte der Oligonukleotidsequenz lokalisiert sein, welche außerdem möglichst mit mindestens einem G oder C enden sollte. Das dem Kit beiliegende PCR-Protokoll wurde der verwendeten Template-Länge (pCMV-F3Ub) angepasst.

Sense (36 bp):

5'-GGTCCTTCGCCTGAGAGGTG**G**AGATCAGATCTTAAG-3'

Antisense (36 bp):

5'-CTTAAGATCTGATCT**C**CACCTCTCAGGCGAAGGACC-3'

2.3.6. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und RT-PCR

Zur Überprüfung der mTH-Expression in NXS2- und SCK-Zellen wurde RNA aus den unterschiedlichen Zellen unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Nach einer Konzentrationsbestimmung wurde eine cDNA-Synthese nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1 μg RNA (in 10 μl dest. H_2O)

2 μl DTT (0.1 M, Invitrogen)

2 μl Hexanukleotide 10x (Roche, Mannheim)

1 μl 1st *strand buffer* (Invitrogen)

1 μl dNTP's (je 10 nM)

Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei 65°C erhitzt, dann für 2 min auf Eis abgekühlt. Um die cDNA-Synthese zu starten, wurde 1 μl Reverse Transkriptase (Superscript II, Roche, Mannheim) zugefügt und die Synthese für 1 h bei 37°C durchgeführt. Eine Inaktivierung des Enzyms erfolgte im Anschluß durch 2minütiges Erhitzen auf 95°C .

Für die PCR zur Überprüfung der mTH- sowie der mGAPDH-Expression (als Kontrolle) wurden folgende Primer verwendet:

Primer zum Nachweis der mTH-Expression:

Sense: Se-mTH365 (25 bp)

5'-GAGGCCACTGGCAGGAAGCCCCCAC-3'

antisense: An-mTH771 (25 bp)

5'-AAGCCTCCAGGTGTTCCCGGCAGGC-3'

Primer zum Nachweis der mGAPDH-Expression:

Sense-Gap (25 bp):

5'-GAGGCCACTGGCAGGAAGCCCCCAC-3'

antisense-Gap (25 bp):

5'-AAGCCTCCAGGTGTTCCCGGCAGGC-3'

Der PCR-Ansatz zum Nachweis der mTH und der mGAPDH sah folgendermaßen aus:

2 µl cDNA aus obigem Ansatz

2 µl sense Primer

2 µl antisense Primer

1 µl dNTPs

5 µl 10xPCR-Puffer

3 µl MgCl₂ (25 mM)

1 µl Taq-Polymerase (5u/µl)

34 µl H₂O dest

Das PCR-Programm war ebenfalls für beide PCRs dasselbe:

95°C 2 min

95°C 20 s

66°C 30 s

72°C 30s

Zyklen: 25

72°C 7 min

4°C ∞

Im Anschluß wurden 5 µl der einzelnen PCR-Ansätze in einem 1.5%igen Agarosegel aufgetragen.

2.4. Nachweis von Proteinexpression in Zellen

2.4.1. Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Überprüfung der Funktionalität des Plasmiddesigns in bezug auf eine effektive Expression der Minigen-Peptide wurden COS7-Zellen transient mit den Minigen-pCMV-F3Ub-(WT)-Plasmiden mit Hilfe des Superfect[®] Transfection Reagent (QIAGEN) transfiziert. Hierbei handelt es sich um ein Polyamidoamin-Dendrimer, welches aufgrund seiner Beschaffenheit DNA komplexiert, so daß die so entstandenen Superfect-DNA-Komplexe leichter in eine eukaryotische Zelle gelangen können. Dies gelingt beispielsweise über negativ geladene Rezeptoren an der Zelloberfläche, an die die positiv geladenen Superfect-DNA-Komplexe binden können. Weiterhin vermag Superfect durch eine Pufferung der Lysosomen nach Aufnahme die lysosomalen Endonukleasen zu inhibieren und so den Abbau der transfizierten DNA zu verhindern. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben, folgende Zellkonzentrationen, DNA-Mengen und Superfect-DNA-Verhältnisse wurden verwendet:

Zellen: 4x10⁵ COS7/well in einer 6-well-Platte

Plasmid-DNA/well: 2 µg

Superfect:Plasmid-DNA: 2:1

Die Probennahme erfolgte nach 5-minütiger Trypsinierung der transfizierten Zellen in Triplets, d.h. 3 wells wurden geerntet pro Zeitpunkt. Probennahme erfolgte zunächst zum Zeitpunkt 0 h, welcher die Beendigung der 2-3ständigen Inkubationszeit der Superfect-DNA-Komplexe mit den COS7-Zellen markiert. Dann wurden Proben in verschiedensten Zeitabständen genommen, über mehrere Tage hinweg bis zu einem Maximum von 96 h. Die trypsinierten Zellen wurden bei 6000 rpm 5 min pelletiert, die Pellets einmal mit PBS (PAA Laboratories) gewaschen, und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Lyse gelagert.

Für die Expressionsexperimente, in denen die Funktionalität des Proteasoms inhibiert werden sollte, wurde den Ansätzen zum Zeitpunkt 0 h $10\text{ }\mu\text{M}$ des Proteasominhibitors Lactacystin (Sigma-Aldrich) zugesetzt und dieser 3 h lang inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel und die Probennahmen wie oben beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten.

2.4.2. Herstellung von Zellysaten für Western Blots

Da in den *in vitro* Experimenten die Expression intrazellulärer Proteine bzw. Peptide nachgewiesen werden sollte, mussten von den nach der Transfektion gewonnenen COS7-Zellpellets Lysate hergestellt werden. Die Pellets wurden hierfür in $60\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer [25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4 (alles Sigma-Aldrich), 1 mM Pefabloc SC, Proteaseinhibitor (beides Roche)] resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden dann entweder bei -80°C gelagert oder bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration auf Eis gelagert.

Proteaseinhibitor: Proteaseinhibitoren-Cocktail Complete, (1 Tablette muss zuerst in 2 ml dest. H_2O gelöst werden, 1 Tablette/50 ml Lysispuffer)

2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellysaten

Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde mittels des Protein Assay von BioRad bestimmt. Dem Assay liegt die Proteinbestimmung nach Bradford zugrunde. Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an positiv geladene Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein.

Es wurde eine BSA (Sigma-Aldrich)-Standardreihe mit Konzentrationen von 10 µg/µl bis 0.15 µg/µl in dest. H₂O hergestellt. Für die Proben, die Standards und den Blindwert wurden jeweils Doppelbestimmungen in einer 96well-Platte durchgeführt. Pro well wurden 250 µl der 1:4 verdünnten BioRad-Protosol-Lösung und 1 µl Probe oder Standard verwendet, während der Blindwert nur aus der 1:4 verdünnten BioRad-Protosol-Lösung bestand. Nach 5minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln wurde die Extinktion in den einzelnen wells bei 595 nm gemessen (Plate reader Ascent, Thermo Lifesciences). Anschließend wurde eine BSA-Standardreihe erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration in den Zellysaten bestimmt werden konnte.

2.4.4. Auftrennung von Zellysaten mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle für eine PAGE verwendeten Chemikalien und Geräte stammen von der Firma Invitrogen.

Die Zellysate wurden mittels einer Gelelektrophorese im Auftrennungssystem von Novex (Invitrogen) in 10-20%-Gradienten Tricin-Gelen aufgetrennt. Die Gelzusammensetzung ist analog zu der von Schaeffer und Jagow im Jahre 1987 entwickelten Methode, wobei hier Tricin die AS Glycin im Laufpuffer ersetzt; das Sammelgel ist dabei 4%ig. Da die Gele kein SDS enthalten, muss der Probenpuffer damit versetzt sein, um bestmögliche Resultate zu erzielen. Die Tricin-Gele eignen sich besonders gut für niedermolekulare Proteine und Peptide.

Zunächst wurden die Zellysate mit dem Probenpuffer (2x Tricine SDS Sample buffer) vermischt und 3 min bei 85°C denaturiert. Anschließend wurde das Gel sowohl mit den Proben als auch 5 µl des Proteinmarkers (MultiMark[®]-Coloured Standard) beladen und die Proteine bei 125 V in einer Gelkammer (XCell Sure-Lock[™] Mini-cell) mit 1x Laufpuffer (10x Tricine SDS Running Buffer) aufgetrennt.

2.4.5. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran (Blotten)

Nach der Gelelektrophorese wurde das Tricin-Gel für einige Minuten in Blottingpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8.3, 192 mM Glycin, 10% Methanol) äquilibriert. Währenddessen wurde ein mit Blottingpuffer getränktes „Sandwich“ folgendermaßen zusammengebaut: zwei Kunststoffschwämme, zwei Lagen Filterpapier (Hybond Blotting Paper, Amersham), das äquilibrierte Gel, eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham), zwei Lagen

Filterpapier und zwei Kunststoffschwämme. Der Transfer erfolgte in einer Blot-Apparatur (XCell II™ Blot Module, Invitrogen) für 45 min bei 30 V.

Nach dem Blotten wurden die auf die Nitrozellulose-Membran farbigen Markerbanden mit einem Bleistift nachgezogen, ebenso wurde auf der Membran die rechte oder linke Seite markiert. Im Anschluss an das Blotten wurde die Membran in einer Immunfärbung weiterverwendet.

2.4.6. Immunfärbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Nach dem Proteintransfer (Blotting) sollten exprimierte (ubiquitinierte) Minigen-Peptide auf der Nitrozellulose-Membran mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Dafür wurde ein Peroxidase-gekoppelter anti-HA-Antikörper (Roche) verwendet, der an den im Minigen enthaltenen HA-Tag bindet. Nach Zugabe eines Substrats (ECL™ Detection Reagents, Amersham) kommt es durch die Peroxidase-vermittelte Umsetzung zu einer Lichtemission an der Stelle auf der Membran, an der der Antikörper bindet. Diese wird dann durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham) auf der Nitrozellulose-Membran sichtbar gemacht. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden die proteinfreien Stellen der Membran zunächst mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 8°C in Blockingpuffer (5% handelsübliches Milchpulver in Waschpuffer) geblockt. Alle Reaktionen wurden in Glasschalen auf Horizontalschüttlern durchgeführt. Nach dem Blocken erfolgte eine 2stündige Inkubation der Membran mit in Blockingpuffer verdünntem anti-HA-Antikörper (0.1 µg/ml). Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen der Membran (1x 15 min, 2x 5 min) mit Waschpuffer (0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich) in PBS) entfernt. Nach einem kurzen Trocknen der Membran auf etwas Filterpapier wurde diese mit der zuvor angesetzten Substratlösung überschichtet und 2 min inkubiert. Das überschüssige Substrat konnte nun abgeschüttelt werden, und es erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms je nach Signalintensität für wenige Minuten bis zu 2-3 h.

2.4.7. Immunfärbung für die Durchflußzytometrie

Für den Nachweis der MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche von NXS2 und SCK-Zellen wurden die Zellen mit FITC-markiertem anti-H2-K^k-Antikörper (*clone* 36-7-5, Becton-Dickinson) gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Als Negativkontrolle dienten SK-N-AS-Zellen.

Für die Färbung wurden die Zellen (1×10^6) in FACS-Röhrchen (5 ml Polystyren Round-bottom Tubes, #2052, Falcon Becton-Dickinson) aliquotiert und pelletiert (5 min, 400 g, 4°C). Die Pellets wurden nun zweimal mit 500 µl FACS-Puffer (PBS, 0.02% NaN₃, 0.1% BSA (beides Sigma-Aldrich)) gewaschen. Die Pellets wurden in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit ca. 1 µg des markierten Antikörpers inkubiert (30-60 min, 4°C, im Dunkeln). Nach zweimaligem Waschen wurde das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nun konnten die Proben der FACS-Analyse zugeführt werden.

2.4.8. Durchflußzytometrie

Die Messung der markierten Zellen erfolgte am FACS-Calibur mit zwei Lasern der Firma Becton-Dickinson. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit den in Tab. 5 aufgelisteten Kombinationen aus Laser und Filtern angeregt und gemessen. Die Geräteeinstellung wurde den jeweiligen Farbstoffen und der Autofluoreszenz angepasst. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest.

Tab. 5: Kombination aus Laser und Filtern beim FACS-Calibur

Kanal	Laser (Anregung)	Filter (Emission)	geeignete Farbstoffe
1	488 nm	530 ± 30 nm	FITC*

*FITC = Fluoresceinisothiocyanat

2.5. Histologie und Immunhistochemie von Gewebeschnitten

Alle verwendeten Lösungen und Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen, sofern nicht anderweitig beschrieben.

2.5.1. Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von Paraffinschnitten

Für eine histologische Untersuchung der Versuchstierorgane wurden die Lebern nach Beendigung eines Mausversuches zur Fixierung in Formalin (phosphatgepufferte Formaldehyd-Lösung, pH 7.0 (46 mM Na₂HPO₄, 29 mM NaH₂PO₄·H₂O, ad 900 ml dest. H₂O, 100 ml Formaldehyd (36-40%)) bei Raumtemperatur aufbewahrt bis zum Anfertigen von Gewebeschnitten. Organstücke wurden in einer Entwässerungskammer (Hypercenter, Shandon) über eine aufsteigende Konzentrationsreihe von EtOH (70-100%) entwässert und mittels einer Paraffin-Einbettungseinheit (von Microm) in Paraffin eingebettet. Von den paraffinierten Leberproben wurden 2-3 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die auf silanisierte Objektträger (Silane-prep Slides, Sigma-Aldrich) aufgebracht wurden.

Alle im folgenden beschriebenen Schritte wurden in Glasküvetten und unter Verwendung von Objektträgerhaltern und eines Horizontalschüttlers durchgeführt.

Die H/E-Färbung erfolgte nach Deparaffinierung in Xylen der Leberschnitte (Xylen, 2x 5 min, RT). Anschließend folgten Waschräume in absteigenden EtOH-Konzentrationen: 2x 8 min in absolutem EtOH, 2x 6 min in 95% EtOH, 2x 6 min in 80% EtOH und 4 min in dest.H₂O. Nun wurde mit Hämatoxylin (Hämatoxylin II nach Gill, Merck) eine Kernfärbung in den Schnitten durchgeführt (0.5-3 min, RT). Es folgten mehrere Waschräume mit dest. H₂O bis das Wasser farblos blieb. Um die Hintergrundfärbung zu minimieren, wurden die Objektträgerhalter zweimal jeweils 10x in eine saure Alkohol-Lösung (400 ml Methanol, 4 ml Essigsäure, 96 ml dest.H₂O) getaucht. Dann wurde mit dest. H₂O, und anschließend mit 80% EtOH gewaschen (je 4 min, RT). Die anschließende Plasmafärbung erfolgte mit Eosin (Eosin G, Waldeck GmbH) (2-3 min, RT). Es folgten nun Waschräume in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe in EtOH: 3x 3 min 95% EtOH, 1x 1 min absol. EtOH, 1x 2-3 min absol. EtOH. Um eine dauerhafte Übersichtung mit Einschlussmedium (Mounting Medium, Shandon) zu ermöglichen, folgten zwei Waschräume à 5 min in Xylen. Nach kurzem Trocknen des Gewebeschnitts wurde dieser mit Einschlussmedium übersichtet und sofort mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die H/E-gefärbten Schnitte können bei Raumtemperatur auf Dauer aufbewahrt werden.

Die Kerne erscheinen im Durchlichtmikroskop violett, das Cytoplasma ist rosa bis rot angefärbt.

2.5.2. Immunhistochemische Färbung von gefrorenen Tumoren

Kryoschnitte von in Einbettmedium eingefrorenen NXS2-Tumorproben aus Mäusen wurden mit einer Dicke von 5 µm an einem Kryostat HM 500 OM von Microm angefertigt und auf silanisierte Objektträger (*Silane-prep Slides*, Sigma-Aldrich) überführt. Sie wurden in eiskaltem 100 % Aceton fixiert (10 min, -20°C), über Nacht getrocknet und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Die bei der immunhistochemischen Färbung eingesetzten Primärantikörper anti-Maus (m)CD4 (*clone* RM4-5) und anti-mCD8 (*clone* 53-6.7) stammten aus der Ratte (r) (beide Becton-Dickinson). Der sekundäre Antikörper war ein biotinylierter anti-rIgG aus dem Kaninchen (Becton-Dickinson). Das verwendete Blocking-Serum (*normal rabbit serum*, Vector Laboratories) entstammte ebenfalls dem Kaninchen. Alle folgenden Schritte fanden bei RT statt.

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte in TBS (7.4 mM Tris Base, 43.5 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) gewaschen (2x 3 min). Ab diesem Punkt dürfen die Gewebeproben nicht austrocknen. Endogene Peroxidasen wurden mit 3% H₂O₂ (30% H₂O₂-Stammlösung, Fluka) blockiert (20 min). Nach Spülung mit dest. H₂O (3x 3 min) folgte die Inkubation mit Blocking-Serum (20 min). Der Primärantikörper wurde 1:25 in Blocking-Serum verdünnt eingesetzt (90 min). Es folgte eine Waschsequenz (3x 3 min) in dest. H₂O und anschließend die Inkubation mit Sekundärantikörper (1:150 in Blocking-Serum, 60-90 min). Nach Waschen (3x 3 min, dest. H₂O) wurden die Schnitte mit Avidin/Biotin-POD-Komplex (R.T.U. Vectastain, *ABC reagent*, Vector Laboratories) inkubiert (60-90 min). Nach Waschen (3x 3 min, dest. H₂O) erfolgte die Zugabe des vorher nach Herstellerangaben angesetzten POD-Substrates (AEC(3-amino-9-ethylcarbazole) *Substrate Kit*, Vector Laboratories) und eine 30minütige Inkubation. Hierbei erfolgt die Umsetzung des Substrats zu einem rötlich gefärbten Reaktionsprodukt. Nach Waschen (2x 3 min) wurden die Schnitte in Hämatoxylin (Hematoxylin QS, Vector Laboratories) gegengefärbt (3-5 min). Dann wurden die Gewebeschnitte mit dest. H₂O solange entfärbt, bis das Wasser klar blieb. Zur Konservierung der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte mit Gelatine (Kaiser's Glycerol Gelatine, Merck) überschichtet und sofort ein Deckgläschen darüber gelegt.

2.5.3. Immunhistochemische Färbung von gefrorenen Nebennieren

Nach dem Ende eines *in vivo*-Versuches wurden den frisch getöteten Mäusen die Nieren entnommen und die als weißliche Kapsel erkennbare Nebenniere abgetrennt und in Einbettmedium in flüssigem Stickstoff langsam eingefroren.

Im Unterschied zur Färbung von gefrorenem Tumormaterial wurden die Kryoschnitte der gefrorenen Nebennieren nicht in eiskaltem Aceton fixiert, sondern für 20 min in 4% Paraformaldehyd inkubiert. Ab hier wurden alle Schritte wie im zuvor beschriebenen Protokoll durchgeführt (2.5.2.). Als Primärantikörper diente 1:100 verdünnter polyklonaler anti-mTH Antikörper (Kaninchen, stock: 0.1 µg/µl, Chemicon, Kalfornien, USA), als Sekundärantikörper, wie zuvor beschrieben, Biotin-gekoppelter anti-rabbit-IgG (Becton-Dickinson).

2.6. Tierexperimentelle Methoden

2.6.1. Mäuse

Die *in vivo*-Versuche wurden mit syngeneten weiblichen A/J-Mäusen durchgeführt, die im Alter von 6-8 Wochen und einem Mindestgewicht von 20 g von Harlan-Winkelmann bezogen wurden. Sie wurden im SPF (Spezifisch Pathogen-frei-)-Bereich der Tierexperimentellen Einrichtung des Virchow-Klinikums gehalten und erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Vor Beginn eines Versuches wurde den Mäusen eine Eingewöhnungszeit von einer Woche gewährt. Dann erfolgte zunächst eine Markierung mittels Ohrloch, Aufteilung in Gruppen zu 6 bzw. 8 Mäusen und eine Gewichtsüberprüfung. Einen Tag vor der subkutanen Tumorzellapplikation wurden die Mäuse im Bereich der linken Flanke mit einem handelsüblichen Bartschneider rasiert. Desweiteren erhielten die Mäuse nach den operativen Eingriffen für zwei Tage ein Analgetikum zur eventuellen Wundschmerzlinderung. Nach Abschluss eines Versuches wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und der weiteren Analyse zugeführt.

2.6.2. Orale Impfung von Mäusen

Für die orale Impfung der A/J-Mäuse wurden die Plasmid-tragenden Salmonellen über Nacht in einer 10 ml-Kultur mit Amp angezogen. Am nächsten Tag wurden die Bakterien pelletiert

(5 min, 6000 rpm) und zweimal mit dest. H₂O gewaschen. Dann wurden sie zunächst in 10 ml dest. H₂O gelöst, eine 1:10 Verdünnung hergestellt und die Absorption der Suspension bei 600 nm in einem Spektrophotometer (PU8625, Philips) bestimmt. Über die Formel $OD_{600} = 0.1 \equiv 1 \times 10^8$ Bakterienzellen/ml wurde die Konzentration errechnet und eine Lösung mit 5×10^8 Bakterienzellen /150 µl in dest. H₂O hergestellt.

Die Gabe der Minigen-Plasmid-tragenden Salmonellen (5×10^8 /Maus) erfolgte oral in einem Volumen von 150 µl mittels einer Magensonde (Biomedical Needles, Popper & Sons, Inc., USA). Dafür wurden die Mäuse mit nach hinten gebeugtem Kopf gehalten, die Magensonde vorsichtig über die Speiseröhre eingeführt und das gewünschte Volumen appliziert.

2.6.3. Tumorzellapplikation und subkutanen Tumorwachstum

Für die Tumorzellapplikation wurden NXS2-Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und schließlich in RPMI-Medium ohne Zusätze in einer Konzentration von 2×10^6 /100 µl aufgenommen. Jeder Maus wurden subkutan, d.h. in eine durch vorsichtiges Heben und Senken der Injektionsnadel geschaffene Hautfalte, 100 µl Tumorzellsuspension injiziert. Fünf Tage nach Tumorzellapplikation hatten die Tumoren eine messbare Größe erreicht. Die Tumorgröße wurde an jedem zweiten Tag mit einer Schiebelehre gemessen und protokolliert. Bei einem Tumolvolumen von 1500 mm^3 erreicht hatten (Berechnung des Volumens s. Formel unten), etwa 15-17 Tage nach Tumorzellapplikation, wurde der Tumor chirurgisch entfernt.

Berechnung des Tumolvolumens:

$$\text{Tumolvolumen [mm}^3] = \frac{1}{2} \times \text{Länge [mm]} \times \text{Breite}^2 [\text{mm}^2]$$

2.6.4. Narkose von Mäusen und operative Entfernung von subkutanen Tumoren

Das OP-Besteck wurde von der Firma Hauptner, Solingen, bezogen. Zur Narkose wurde den Mäusen 150-200 µl einer Xylazin/Ketamin-Mischung (10% (v/v) Xylazin, 10% (v/v) Ketamin, ad X ml sterile PBS) intraperitoneal injiziert. Dies entspricht bei einem durchschnittlichen Körpergewicht einer Maus von 20-25 g 16-20 µg Xylazin (Rompun[®] (Xylazinhydrochlorid), 2%, Bayer) und 80-100 µg Ketamin (Ketavet[®] Ketamin-

hydrochlorid 100 mg/ml, Pharmacia) pro Gramm Körpergewicht. Die Narkose trat nach etwa fünf Minuten ein und dauerte 30-60 min.

Die narkotisierten Mäuse wurden auf dem Rücken liegend operiert. Nach großflächiger Reinigung der Operationsfläche mit 70% Ethanol wurde der Tumor angehoben und unmittelbar am unteren Rand die Haut mit einer kleinen Schere eingeschnitten. Der subkutan gewachsene Tumor wurde vom darunterliegenden Bauchfell gelöst. Nach Entfernung des Tumors wurde dieser gewogen immunhistochemische Färbungen in Einbettmedium (Einbettmedium für Gefrierschnitte, Jung) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Wunde wurde mit Wund-Klammern (Autoclip 9mm, Clay Adams, Becton-Dickinson) verschlossen. Unmittelbar nach dem Verschließen der Wunde wurde den Mäusen 100 μl eines Analgetikums (Finadyne[®] (Flunixin), Injektionslösung 1%, Essex Tierarznei) in das Nackenfell injiziert. Die Wirkung dieser Injektion hält für 24 h vor, weshalb am nächsten Tag zur gleichen Uhrzeit eine weitere Injektion mit dem Schmerzmittel erfolgte.

Die Mäuse wurden bis zum vollständigen Erwachen in Käfigen mit Rotlichtbestrahlung gehalten. Anschließend erfolgte das Umsetzen in neue Käfige. Die Wundheilung wurde in der Folgezeit täglich kontrolliert. Zehn Tage nach OP wurden die Wundklammern entfernt.

2.6.5. Beendigung eines Mausexperiments

Etwa 3-4 Wochen nach der operativen subkutanen Tumorentfernung bilden sich spontane Metastasen in sekundären Organen, wie der Leber, dem Knochenmark, den Nieren, der Lunge und den Ovarien. Zu diesem Zeitpunkt wurde deshalb aufgrund des sich verschlechternden Allgemeinbefindens der Tiere in der Kontrollgruppe ein *in vivo*-Experiment beendet.

Den Tieren wurde zur weiteren Analyse zunächst unter sterilen Bedingungen die Milz entfernt. Aus dieser wurden anschließend Lymphozyten isoliert (s. Abschnitt 2.7.1.).

Desweiteren wurde die Leber entnommen, gewogen und der Metastasierungsgrad bestimmt. Dazu wurden die Tumorknoten (Metastasen) gezählt und der prozentuale Anteil an Metastasen im Vergleich zur Gesamt-Leberoberfläche bestimmt. Außerdem wurden die Lebern zur besseren Dokumentation sofort oder zu einem späteren Zeitpunkt fotografiert. Durch das Überschichten mit Formalin (s. dazu Abschnitt 2.5.1.) können die Organe hierbei dauerhaft haltbar gemacht werden. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

Neben der Leber werden zur vollständigen Auswertung der Effektivität der eingesetzten Vakzine weitere Organe entnommen und teilweise in Einbettmedium bei -80°C schockgefroren und in Formalin eingelegt. Dazu gehören: Nieren, Nebennieren, Ovarien und das Herz. Außerdem wird der Zustand der inneren Organe im allgemeinen bestimmt und im Protokoll festgehalten.

2.7. Funktionelle Analyse von murinen Lymphozyten *ex vivo*

2.7.1. Isolierung von mononukleären Zellen aus lymphatischen Organen

Die folgenden Arbeitsschritte fanden stets unter sterilen Bedingungen statt. Nach der Entnahme der Milzen aus Mäusen jeweils einer Versuchsgruppe wurden diese zunächst in einer Petrischale mit etwas RPMI-Medium (mit 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin, PAA) benetzt und mit einer Schere grob zerkleinert. Dann wurde der Stempel einer 5 ml-Spritze entnommen und mit der gummibeschichteten Seite die Organstücke mit kreisenden Bewegungen zerdrückt. Das faserige Gewebe wurde mit einer 10 ml-Pipette auf ein Zellsieb (Zellsieb, 70 μm Nylon, Becton Dickinson) gegeben und mit dem Spritzenstempel durch den Filter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gedrückt. Die Petrischale wurde mit etwas RPMI-Medium nachgespült und die „Spülflüssigkeit“ ebenfalls durch das Sieb gepresst. Insgesamt wurden hierfür 5 ml Medium pro entnommener Milz eingesetzt. Die isolierten PBMC's wurden nun pelletiert (10 min, 400xg, 4°C) und der Überstand verworfen. Zur Entfernung der roten Blutkörperchen wurden die Milzzellen in ACK-Lysepuffer (0.15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA, ad 1 l dest H_2O , pH 7.2-7.4), 5 ml/Milz, resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und anschließend erneut pelletiert (5 min, 200xg, 4°C) und in komplettem RPMI-Medium resuspendiert ($1\text{-}5 \times 10^8$ Zellen/5 ml). Zur Entfernung toter Zellen wurde nun eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durchgeführt. Dazu wurde die Zellsuspension mit 5 ml Ficoll (Raumtemperatur!) unterschichtet und zentrifugiert (15 min, 500xg, RT). Die vitalen Lymphozyten befinden sich hiernach in der Oberphase. Sie wurden vorsichtig mit einer 5 ml-Pipette abgesaugt und in ein neues Röhrchen überführt. Zum Waschen (2x) wurden die Zellen mit 40 ml komplettem RPMI-Medium aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 200xg). Die Lymphozyten wurden nun in T-Zell-Medium (s. Abschnitt 2.2.) aufgenommen, ausgezählt und mit einer Konzentration von $5\text{-}10 \times 10^7$ Zellen/10 ml in 250ml-Zellkulturflaschen (75 cm^2) überführt. Zur Reaktivierung der isolierten T-Lymphozyten wurden der Zellsuspension mit 50 Gy

bestrahlte, dadurch wachstumsunfähige NXS2-Zellen in einem Verhältnis von 100:1 (Lymphozyten:NXS2) beigefügt. Die Reaktivierung erfolgte für 4-5 Tage, woraufhin die Lymphozyten in Zytotoxizitätsversuchen eingesetzt wurden.

Die Bestrahlung der NXS2-Zellen erfolgte im Gamma-Bestrahlungsgerät Mevatron der Strahlenklinik der Charité.

2.7.2. Messung der Aktivität isolierter Lymphozyten mittels IFN- γ -ELISA

Die nach Beendigung eines Tierexperiments aus der Milz isolierten Lymphozyten wurden weiterhin auf ihre Aktivität hin untersucht. Hierfür wurde die IFN- γ -Freisetzung der Zellen über mehrere Tage gemessen. 1×10^6 Lymphozyten wurden in 3 ml T-Zell-Medium in 6well-Platten ausplattiert und verschiedenen Stimuli ausgesetzt: 100 IE IL-2/ml, 50 IE IL-2/ml, bestrahlte, inaktivierte NXS2-Zellen (in einem Verhältnis 100:1 Lymphozyten:NXS2) +/- IL-2 und Concanavalin A (ConA) (5 μ g/ml) zur Bestimmung der maximalen IFN- γ -Freisetzung. Über vier Tage wurden je 250 μ l Medium entnommen, enthaltene Zellen abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm) und die Überstände bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Der Nachweis von IFN- γ fand mittels eines ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) unter Verwendung des *mouse* Interferon- γ -Kits von Roche statt.

2.7.3. Messung der zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten mittels Zytotoxizitäts-Assay

Um die Effektivität der eingesetzten DNA-Vakzine zur Induktion einer anti-tumoralen CD8-T-Zell-vermittelten Immunantwort *in vitro* zu testen, wurden die Milzzellen in einem Chrom(Cr)51-*release*-Assay eingesetzt. Hierbei werden die Zielzellen (*target* (T) *cells*) mit Cr51 gelabelt, dann gewaschen und in verschiedenen Verhältnissen mit Effektorzellen (E), hier die isolierten Milzzellen inkubiert. Die Menge an Cr51, die durch die Lyse der Zielzellen in den Überstand freigesetzt (*release*) wird, wird mit Hilfe eines γ -Scintillationszähler quantifiziert. Über einen Vergleich mit spontan freigesetztem Cr51 in der Kontrolle und dem maximal freigesetztem Cr51 aus vollständig lysierten Zielzellen lässt sich die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen in „%Lyse“ über folgende Formel errechnen:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{experimentelle Freisetzung [cpm]} - \text{maximale Freisetzung [cpm]}}{\text{maximale Freisetzung [cpm]} - \text{spontane Freisetzung [cpm]}} \times 100$$

Um eine eventuelle NK-Zell-vermittelte Lyse auszuschließen, wurden als Zielzellen auch YAC-1-Zellen, eine murine Lymphomzelllinie, im Cr51-*release*-Assay eingesetzt.

Zunächst wurden die Zielzellen geerntet und einmal mit serumfreien Medium gewaschen (RPMI1640 oder DMEM High Glucose, PAA). Nun wurden 2×10^6 Zellen/1.5 ml in ein 15ml-Falconröhrchen gegeben und 0.5 mCi Cr51 (Stammlösung 1 mCi/ml, Perkin Elmer) zugefügt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und die Zellen alle 20-30 min aufgeschüttelt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit komplettem Medium gewaschen, d.h. 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, in 5 ml neuem Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 2 ml komplettem Medium resuspendiert, wobei hier von einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml ausgegangen wurde. Für den Zytotoxizitäts-Assay wurden nun 5×10^3 gelabelte Zielzellen in 100 µl Medium auf einer 96well-Platte verteilt und Effektorzellen ebenfalls in 100 µl des gleichen Mediums in verschiedenen Effektor:Zielzell-Verhältnissen (effector:target ratio = E:T ratio) in Dreifachbestimmungen hinzugefügt; folgende E:T Verhältnisse wurden eingesetzt: 6.25:1, 12.5:1, 25:1, 50:1, 100:1. Außerdem wurden mehrere wells nur mit Zielzellen und 100 µl Medium beschickt, um eine Aussage über die spontane und die maximale Cr51-Freisetzung machen zu können. Die Inkubation erfolgte nun bei 37°C und 5% CO₂ für 4-10 h. Die ersten Proben wurden nach 4 h genommen, die zweiten nach 8-10 h. Hierfür wurde die 96well-Platte 10 min bei 300 x g zentrifugiert und die Überstände in Röhrchen (5ml, No.55.476, Sarstedt) überführt. Für die maximale Cr51-Freisetzung wurden die Zielzellen zuvor durch Zugabe von 10%iger SDS-Lösung vollständig lysiert. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wurde mittels eines γ -Zählers (1470 Wizard, Firma Wallace, Perkin Elmer) bestimmt.

2.7.4. Beladen von MHC-Klasse-I-Molekülen auf SCK-Zellen mit exogenen Peptiden

Die Mamma-Karzinom-Zelllinie SCK, welche das Tyrosinhydroxylase-Antigen nicht exprimiert, sollte als Zielzelle in einem Zytotoxizitätsassay am Ende eines herkömmlichen Vakzinierungsexperiments mit *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub eingesetzt werden. Zuvor sollten die H2-K^k-Moleküle auf der Zelloberfläche dieser Zellen mit den drei *mTH3kepis*-Peptiden beladen werden, um zu testen, ob diese Zellen einer Lyse durch zytotoxische T-Zellen aus den geimpften Mäusen ausgesetzt sind. Dies wäre ein Beweis dafür, dass die Vakzinierungsstrategie in der Tat eine spezifische CD8⁺T-Zellantwort

induziert. Um exogene Peptide von intakten Zellen in MHC Klasse I präsentieren zu lassen nutzt man eine spontane Anlagerung von Peptiden an MHC-Klasse-I-Moleküle (*pulsing*), wenn die Peptide im Überschuß im Medium vorhanden sind und sie zusätzlich noch für das jeweilige MHC-Klasse-I-Molekül eine hohe Bindungsaffinität aufweisen (Kubitscheck *et al.* 1992) (Rodriguez *et al.* 1999). Bei genügender Konzentration und/oder besonders starker Bindungsaffinität kann es auch zu einer kompetitiven Bindung an bereits beladene MHC-Klasse-I-Moleküle kommen.

Für das *pulsing* wurden 2×10^6 Zellen über Nacht in komplettem RPMI-Medium bei 37°C inkubiert. Dem Medium wurden die drei Peptide FETFEAKI, EERDGNV und VEYTKKEI in Kombination mit einer jeweiligen Konzentration von 0.1 µg/ml zugesetzt. Kurz vor dem Einsatz als Zielzellen im *Cr-release-assay* wurden die beladenen Zellen einmal mit Medium gewaschen und im Anschluß wie bereits beschrieben mit Cr51 versetzt.

2.8. Statistik

Die statistische Signifikanz von unterschiedlichen Ergebnissen zwischen verschiedenen (Maus-) Gruppen wurde mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test bestimmt ($n \geq 6$). Die Ergebnisse werden als statistisch signifikant betrachtet, wenn der p-Wert < 0.05 liegt. Bei einigen Ergebnissen fiel die Signifikanz noch deutlicher aus (p-Werte < 0.01 oder 0.005); an solchen Stellen ist dies gesondert gekennzeichnet.

Ergebnisse, die jeweils mit drei Stichproben erzielt wurden, wurden aufgrund fehlender Validität nicht auf statistische Unterschiede hin untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Konstruktion der unterschiedlichen Minigen-DNAs mittels überlappender PCR

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Vakzine wurden je zwei zusammengehörende, überlappende Primer in einer PCR-Reaktion, wie unter Abschnitt 2.3.1. beschrieben, eingesetzt. Die bei verschiedenen *annealing*-Temperaturen erhaltenen PCR-Produkte wurden in ihrer Gesamtmenge in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 9). Da bei dieser PCR keine klare 160 bp große Bande entstand, wurde der gesamte „DNA-Schmier“ in einer Höhe von ca. 160 bp aus dem Gel isoliert und anschließend die Konzentration der erhaltenen DNA bestimmt.

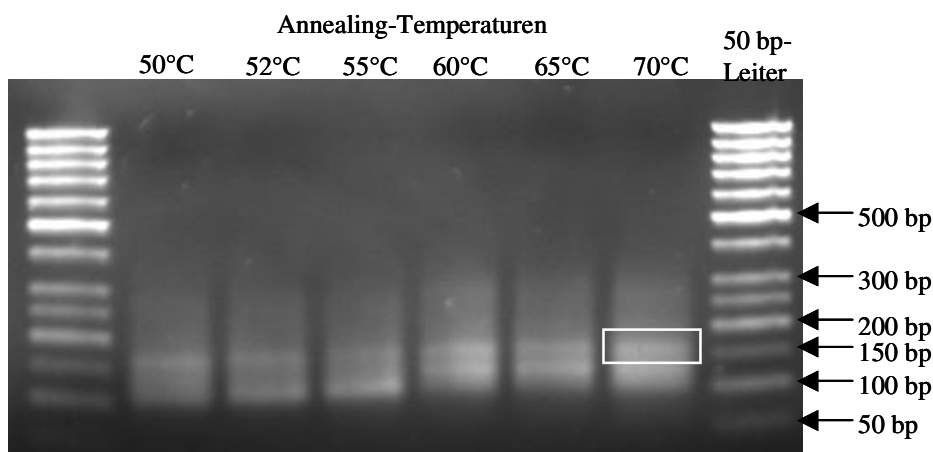


Abb. 9: Auftrennung der nach einer überlappenden PCR erhaltenen Minigen-DNA im Agarosegel

Repräsentatives Bild einer überlappenden PCR in einem 2%igen Agarosegel zur Herstellung eines DNA-Minigens. Die gesamten PCR-Ansätze wurden in diesem Gel aufgetragen, die verschiedenen Spuren sind durch die jeweils verwendete *annealing*-Temperatur gekennzeichnet. Als Marker diente eine 50 bp-Leiter. Das weiße Rechteck markiert den Bereich, der aus dem Gel herausgeschnitten wurde, um die darin befindliche Minigen-DNA zu isolieren.

Die aus dem Gel isolierte DNA wurde nun zunächst zur Sequenzverifizierung in den pGEM[®]-T Easy-Vektor kloniert und in *E.coli* JM109 vermehrt. Mehrere Kolonien wurden gepickt, die Plasmid-DNA isoliert und mit *Eco*RI (die MCS flankierende Schnittstellen im pGEM[®]-T Easy-Vektor) sowie mit *Bgl*II (im Minigen enthaltene Schnittstellen) verdaut. Nur Klone, bei denen bei beiden Restriktionen ein ca. 160 bp großes Fragment im Agarosegel

sichtbar war (nicht gezeigt), wurden der Sequenzanalyse unter Verwendung der Sequenzierprimer M13-uni (-29) und M13 reverse (-29) zugeführt.

3.2. Subklonierung von Minigen-DNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-F3Ub

Nach Sequenzvergleich wurden die Minigen-DNA-Fragmente mittels eines *Bgl*II-Verdau aus dem pGEM[®]-T Easy-Vektor herausgeschnitten und in den zuvor mit *Bgl*II linearisierten und mit Alkalischer Phosphatase behandelten pCMV-F3Ub-Vektor subkloniert. Nach Anzucht in *E.coli* mußten der Einbau und die korrekte Orientierung des Minigen-Fragments mittels *Bgl*II- bzw. *Eco*RI-Verdau überprüft werden (s. Abschnitt 1.5). Dabei entstehen bei *Bgl*II-Verdau Banden mit einer Größe von ca. 160 bp (Abb. 10). Ein Verdau mit *Eco*RI führt bei korrektem Einbau zu Fragmenten mit einer Größe von ca. 1260 bp, bei falscher Orientierung jedoch zu Fragmenten in einer Höhe von 1100 bp (Abb. 11).

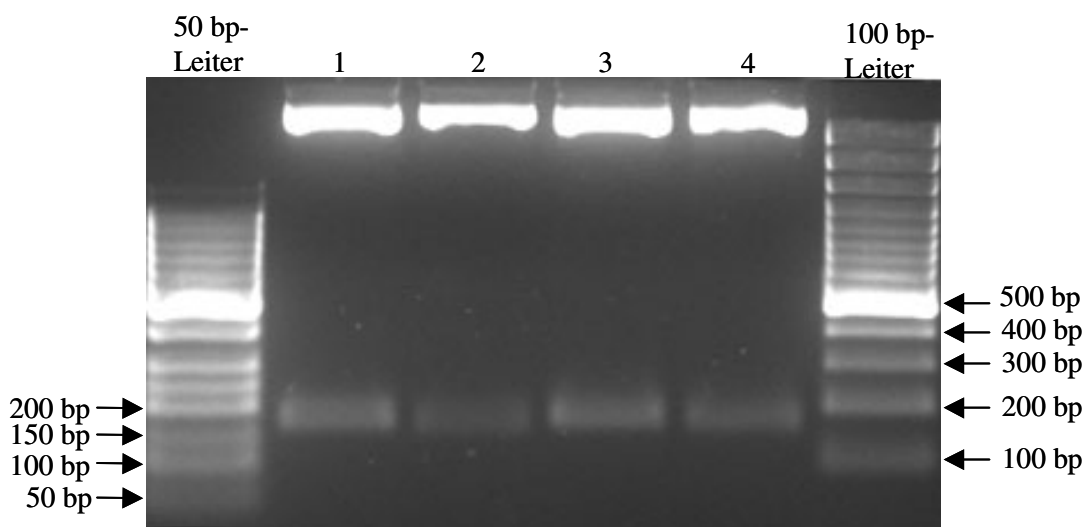


Abb. 10: Nachweis der Minigen-DNA im Vektor pCMV-F3Ub durch Verdau mit *Bgl*II

In der obigen Abbildung ist der Nachweis des Einbaus der Minigen-DNA in pCMV-F3Ub dargestellt. Nach Subklonierung der Minigen-DNA-Fragmente über die *Bgl*II-Schnittstelle in den pCMV-Vektor wurde dieser mit *Bgl*II geschnitten, es erscheint eine ca. 160 bp große Bande. Spur 1: *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub, Spur 2: *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub, Spur 3: *mTHlowest*-pCMV-F3Ub. In Spur 4 ist zum Vergleich eine Negativkontrolle mitgeführt, in der die Minigen-DNA falsch herum im pCMV-Vektor integriert hat (s. dazu Abb. 11). Als Größenstandards wurde je eine 50 bp-Leiter und eine 100 bp-Leiter mitgeführt. Die obige Abbildung ist repräsentativ für die Minigen-Fragmente im mutierten Vektor pCMV-F3Ub-WT.

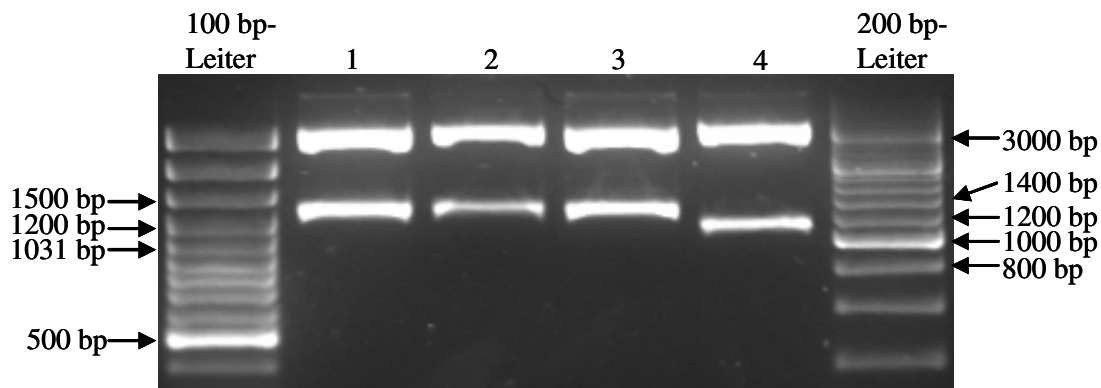


Abb. 11: Nachweis der korrekten Orientierung der Minigene im Vektor pCMV-F3Ub durch Verdau mit *EcoRI*

In dieser Abbildung ist der Nachweis der korrekten Orientierung der Minigene im Vektor pCMV-F3Ub dargestellt. Nach Subklonierung der Minigen-DNA-Fragmente über die *BglII*-Schnittstelle in den pCMV-Vektor wurde dieser mit *EcoRI* geschnitten: bei korrektem Einbau erscheint eine ca. 1260 bp große Bande, bei falscher Orientierung dagegen ein ca. 1100 bp großes Fragment, wie in Spur 4, einer Negativkontrolle, zu erkennen. Spur 1: *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub, Spur 2: *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub, Spur 3: *mTHlowest*-pCMV-F3Ub. Als Größenstandards wurden eine 100 bp-Leiter und eine 1 kb-Leiter mitgeführt. Die obige Abbildung ist repräsentativ für die Minigen-Fragmente im mutierten Vektor pCMV-F3Ub-WT.

E.coli-Klone, welche die Minigen-DNA in korrekter Form enthielten, wurden als Glycerol-Stock bei -80°C aufbewahrt. Desweiteren wurde die pCMV-Plasmid-DNA der Minigene *mTH3k-epis*, *Ersatzepis* und *mTHlowest* in den für die *in vivo*-Experimente verwendeten *Salmonella typhimurium*-Stamm SL7207 mittels Elektroporation transformiert. Die somit erhaltenen Vakzine wurden ebenfalls als Glycerol-Stock bei -80°C gelagert.

3.3. Wiederherstellung des WT-Ub-Gens im Vektor pCMV-F3Ub

Um die Auswirkungen der C-terminal eingeführten Gly₇₆→Ala₇₆-Mutation im Vektor pCMV-F3Ub auf die Ubiquitinierung zu untersuchen, sollten die Minigene *mTH3kepis* und *Ersatzepis* in das Plasmid pCMV-F3Ub-WT eingebaut werden, in dem das WT-Ub-Gen durch eine Ala₇₆→Gly₇₆-Mutation wiederhergestellt wurde.

Die WT-Ub-Sequenz im leeren Vektor pCMV-F3Ub wurde mittels zielgerichteter Mutagenese wieder hergestellt (Abschnitt 2.3.6.). Hierzu wurde der QuikChange[®] Site-directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Herstellerangaben verwendet. Nach Verifizierung der Rückmutation durch Sequenzierung wurden die Minigen-DNA-Fragmente

mittels *Bgl*III-Verdau aus den bereits hergestellten Plasmiden *mTH3kepis*, *Ersatzepis* und *mTHlowest* herausgeschnitten und ebenfalls über *Bgl*III in den mutierten pCMV-F3Ub-WT-Vektor subkloniert. Auch hier wurde die Insertion der verschiedenen Minigen-DNA-Fragmente mittels *Bgl*III-Verdau überprüft, die korrekte Orientierung der Minigene mit einem *Eco*RI-Verdau. Da sich durch die Rückmutation (Ala₇₆→Gly₇₆) das Restriktionsmuster im Vergleich zum pCMV-F3Ub nicht ändert, ist das Ergebnis an dieser Stelle nicht gezeigt.

Die so hergestellten Plasmide *mTH3kepis*-pCMV-WT, *Ersatzepis*-pCMV-WT und *mTHlowest*-pCMV-WT wurden ebenfalls zur Herstellung der für die *in vivo*-Experimente benötigten oralen Vakzine in den *S. typhimurium*-Stamm SL7207 mittels Elektroporation transformiert und bei –80°C als Glycerol-Stock gelagert.

3.4. Das Minigen-Design im Vektor pCMV-F3Ub vermittelt die Expression und Polyubiquitinierung der Minigen-Peptide *in vitro*

Die Expression der Minigen-Peptide wurde anhand von Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Dafür wurden COS7-Zellen transient mit pCMV-F3Ub-DNA von *mTH3kepis*, *Ersatzepis* und *mTHlowest* transfiziert (s. Abschnitt 2.4.1.). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Der Gesamtproteingehalt in den Lysaten wurde mit dem Protein Assay von BioRad bestimmt und ca. 50-100 µg pro Probe im Western Blot eingesetzt. Die Detektion der Minigen-Peptide erfolgte mittels Immunfärbung unter Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten anti-HA-Antikörpers, der an den in den Minigen-Peptiden enthaltenen HA-Tag bindet (s. Minigen-Design, Abschnitt 1.6 und Abb. 1.5). In Abb. 12 ist die Expression der Minigen-Peptide *mTH3kepis* (A) und *Ersatzepis* (B) dargestellt. In den durchgeführten Studien zeigte sich eine Expression der Minigen-Peptide erst nach ca. 24 h (nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurde später auf eine mehrfache Probennahme in diesem Zeitraum verzichtet. Gut zu erkennen sind die nicht ubiquitinierten Minigen-Peptide mitsamt des HA-Tags bei einer Größe von 4.9 kDa nach 27 h (A) und 4.6 kDa nach 25 h (B). Außerdem kann die Bande in einer Höhe von ca. 13 kDa der monoubiquitinierten Form der Minigen-Peptide zugeordnet werden, die in Abb. 12 B mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet ist. Die Banden in den höhermolekularen Bereichen entsprechen polyubiquitinierten Formen der Minigen-Peptide, deren Intensität interessanterweise mit der Zeit abnimmt. Parallel dazu scheint die exprimierte Menge an nicht-ubiquitiniertem Minigen-Peptid in dieser Zeit zuzunehmen, was besonders in Abb. 12

(A) deutlich wird. Die beiden Abbildungen sind repräsentativ für die *in vitro*-Expression des *mTHlowest*-Minigens, weshalb hier auf eine Darstellung verzichtet wird.

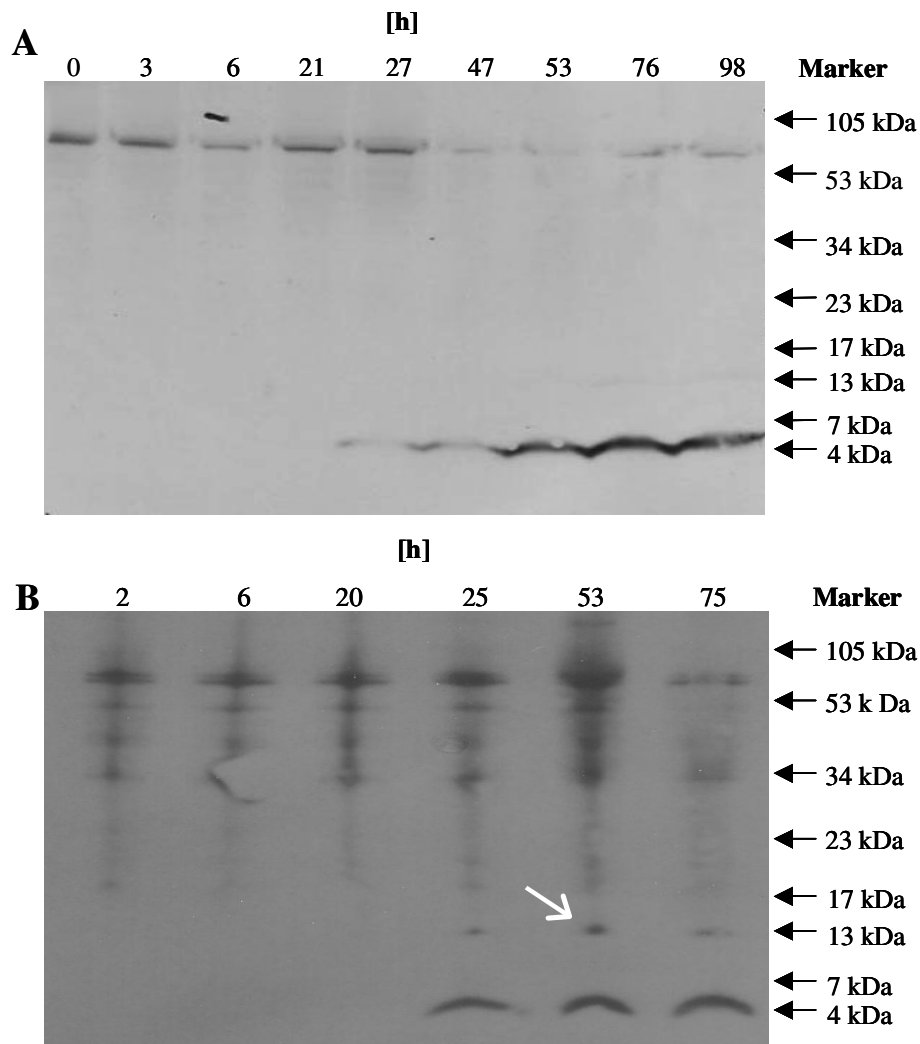


Abb. 12: Expression der Minigen-Peptide in pCMV-F3Ub in COS7-Zellen

In den obigen Abbildungen ist die *in vitro*-Expression der Minigen-Peptide *mTH3kepis*- (oben) und *Ersatzepis* (unten) nach transienter Transfektion in COS7-Zellen gezeigt. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Spuren) wurden die Zellen geerntet, lysiert und 50-100 µg Zellysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Blotting der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Detektion mittels Autoradiographie unter Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten anti-HA-Antikörpers. Als Größenstandard (jeweils rechte Spur) wurde der MultiMark®-Coloured Standard (Invitrogen) mitgeführt. Im unteren Teil der Abbildungen sind jeweils 27 h (oben) bzw. 25 h (unten) nach Transfektion deutlich Banden zu erkennen, die in ihrer Intensität bis zum Ende der Probennahme zunehmen. Sie entsprechen in ihrer Größe dem Minigen-Peptid samt HA-Tag (Größe 4.9 kDa für *mTH3kepis*, 4.6 kDa für *Ersatzepis*). Außerdem ist, wenn auch teilweise schwach, eine monoubiquitinierte Form der Peptide zu erkennen, gekennzeichnet durch den weißen Pfeil (Größe ca. 13 kDa). Die Banden in den höhermolekularen Bereichen können verschiedenen polyubiquitinierten Formen der Minigen-Peptide zugeordnet werden. Dieses Ergebnis wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert.

3.5. Das Minigen-Design vermittelt einen proteasomalen Abbau der Minigen-Peptide *in vitro*

Um die Beteiligung des Proteasoms am Abbau der durch das Minigen-Design vermittelten ubiquitinierten Minigen-Peptide nachzuweisen, wurden die Minigen-pCMV-F3Ub-Plasmide in COS7-Zellen transient exprimiert. Um das Proteasom außer Funktion zu setzen, wurden die transfizierten Zellen ab dem Zeitpunkt 0 h mit dem Proteasominhibitor Lactacystin (LC) 3 h lang inkubiert (10 μ M). Danach wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen, mit frischem Medium überschichtet und weiter bei 37°C inkubiert. Die Probennahme erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten wie in Abschnitt 3.4 beschrieben. Die Detektion der Minigen-Peptide verlief wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, s. Abb. 12 A und B.

Der Einfluß des Proteasominhibitors Lactacystin wird in beiden Abbildungen dadurch deutlich, daß polyubiquitinierte Formen der Minigen-Peptide stabil exprimiert werden. Dies zeigt die dauerhafte Intensität der hochmolekularen Banden über einen langen Zeitraum (bis zu 140 h nach Transfektion). Dagegen tauchen keine nicht-ubiquitinierten Formen der Minigen-Peptide auf.

Die beiden Abbildungen 13 A und B sind wiederum repräsentativ für die *in vitro*-Expression des *mTHlowest*-Minigens, weshalb hier auf eine Darstellung verzichtet wird.

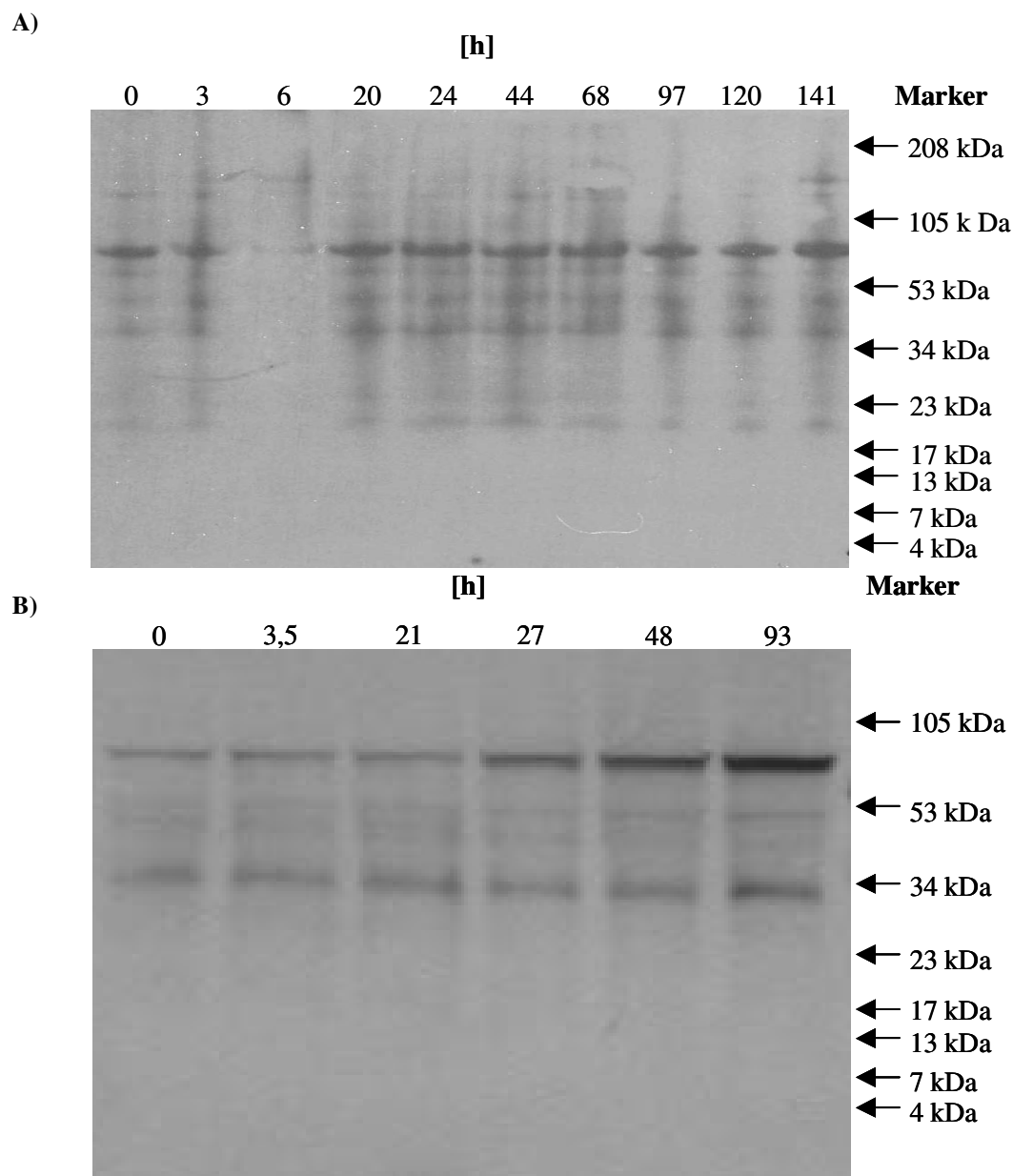


Abb. 13: Expression der Minigen-Peptide in COS7-Zellen unter Einfluß eines Proteasominhibitors

In den obigen Abbildungen ist die *in vitro*-Expression der Minigen-Peptide *mTH3kepis*- (A) und *Ersatzzepis* (B) unter Einfluß des Proteasominhibitors Lactacystin nach transienter Transfektion von COS7-Zellen gezeigt. COS7-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.4.1. beschrieben mit den Minigen-pCMV-F3Ub-Plasmiden transfiziert. Nach Transfektion wurden die Zellen für 3 h mit 10 µM des Proteasominhibitors Lactacystin (LC) inkubiert, wonach die Zellen einmalig mit Medium gewaschen und anschließend weiter mit frischem Medium inkubiert wurden. Die Probenahme erfolgte nach den die einzelnen Spuren kennzeichnenden Zeitpunkten. Nach Lyse der Zellen wurden 50-100 µg der Zellysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Blotten der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Detektion mittels Peroxidase-gekoppeltem anti-HA-Antikörper. Als Größenstandard (jeweils rechte Spur) wurde MultiMark®-Coloured Standard (Invitrogen) mitgeführt. In beiden Abbildungen sind polyubiquitinierte Formen der beiden Minigene zu erkennen (zwischen

208 und 23 kDa (A) und 105 und 34 kDa (B)), wobei ihre Intensität über einen langen Zeitraum stabil bleibt. Dagegen werden weder die monoubiquitinierten (ca. 13 kDa) noch die nicht-ubiquitinierten Minigene (ca. 5 kDa) sichtbar.

3.6. Die Wirksamkeit der DNA-Vakzine *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub *in vivo*

Das NXS2-Mausmodell bietet aufgrund der hohen Aggressivität des Tumors ein über alle Experimente hinweg gleichbleibendes Krankheitsbild, in dessen Verlauf man mehrere Möglichkeiten hat, die Anti-Tumorantwort eines Impfstoffes direkt zu erkennen. Dazu gehört ein Einfluß auf das Primärtumorstadium an sich, welches sich erstens durch Messen der Tumorgößen ermitteln läßt und sich zweitens in den Tumorgewichten nach operativer Entfernung widerspiegelt. Ein weiterer Vorteil dieses Modells besteht darin, auch eine andauernde Immunität nachzuweisen, indem am Versuchsende der Metastasierungsgrad der Leber, einem der Organe, die besonders von NXS2-Zellen infiltriert werden, ermittelt wird. Dazu dienen die Ermittlung der Lebergewichte und die Bestimmung des Grades der Metastasierung. Es findet hierbei folgende Einstufung statt:

keine Metastasen, 0% = 0, <20% Metastasierung = 1, 20-50% Metastasierung = 2, >50% Metastasierung = 3.

An dieser Stelle ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, daß es bei einem *in vivo*-Modell generell zu Schwankungen kommen kann, die sich im vorliegenden NXS2-Maus-Modell in geringer Homogenität von Ergebnissen wie Tumorgößen, Tumorgewichten und Lebergewichten äußern können. Ein Beispiel für diese Heterogenität stellt die Streuung der Tumorgewichte der Kontrollgruppe in Abbildung 15 dar (s. S. 55). Da aber alle Werte aus einer Mausgruppe für die Berechnung der Mittelwerte, Mediane und die statistischen Vergleiche mit den anderen Gruppen herangezogen werden, sind auch alle in den einzelnen Diagrammen dargestellt.

Desweiteren konnte in den Versuchen beobachtet werden, daß die spontane Metastasierung in die Lebern die verlässlichste Größe zur Beurteilung der Effektivität der eingesetzten DNA-Vakzine ist. Die Ausbreitung von Metastasen in andere Organe geschieht dagegen nicht einheitlich, sondern fällt von Experiment zu Experiment unterschiedlich aus. Da kein konstantes extrahepatisches Metastasierungsmuster auftritt, wurden für die vorliegende Arbeit nur die Metastasierungsgrade der Lebern herangezogen.

Im Folgenden wird zunächst besonderes Augenmerk auf die makroskopischen Resultate gelegt. Die dargestellten Ergebnisse stammen jeweils aus zwei unabhängig voneinander

durchgeführten *in vivo*-Experimenten und sind repräsentativ. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) wurde für die Tumor- und Lebergewichte mittels eines Kruskal-Wallis-Tests bestimmt.

Einleitend mußte eine anti-Tumor-Wirksamkeit des leeren pCMV-Vektors ausgeschlossen werden. Hierzu wurde das Tumorwachstum in zwei Mausgruppen untersucht. Eine Gruppe blieb während des Versuchs unbehandelt, während die zweite als Impfstoff *S. typhimurium*-Bakterien erhielt, die mit dem leeren pCMV-F3Ub-Vektor transformiert waren. Nach subkutaner Injektion der Neuroblastomzelllinie NXS2 wurde das Tumorwachstum verfolgt. Es ergab sich kein Unterschied in den beiden Wachstumskurven (nicht gezeigt), weshalb in allen folgenden *in vivo*-Experimenten auf das Mitführen einer zweiten Kontrollgruppe (Leervektor) neben einer unbehandelten Gruppe verzichtet wurde.

3.6.1. Die putativ hoch affinen MHC-Klasse-I-Liganden aus der mTH-Sequenz vermitteln ein reduziertes Tumorwachstum *in vivo*

Nachdem eine Expression der Minigen-Peptide im pCMV-F3Ub-Vektor *in vitro* nachgewiesen und auch eine Beteiligung des Proteasoms am Abbau der Minigen-Peptide gezeigt werden konnte, wurde zunächst die anti-Tumor-Wirksamkeit der DNA-Vakzine *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub *in vivo* miteinander verglichen. Die *Ersatzepis* sind dabei natürliche, auf NXS2-Neuroblastomzellen exprimierte MHC-Klasse-I-Liganden, während die *mTH3kepis* drei vorhergesagt starke MHC-Klasse-I-Liganden aus der mTH-Sequenz darstellen (s. Abschnitt 1.6.).

Dafür wurden A/J-Mäuse ($n=6$) dreimal mit zweiwöchigem Abstand mit *S. typhimurium*-Bakterien oral geimpft (2.6.2.), die mit den Plasmiden *mTH3kepis*- bzw. *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub transformiert waren. Eine Woche nach der letzten Impfung erfolgte die subkutane Injektion der Neuroblastomzelllinie NXS2 in die linke Flanke der Mäuse. Nach ca. 5 Tagen hatte sich ein meßbarer Tumor etabliert, dessen weiteres Wachstum in den darauffolgenden Tagen verfolgt wurde. Nach 17 Tagen wurden den Mäusen die subkutanen Tumoren in einer Operation unter Narkose entfernt, ihr Gewicht bestimmt und die Mäuse über einen Zeitraum von ca. 3.5 Wochen bis zur Entwicklung von Lebermetastasen weiterbeobachtet. Die entfernten Tumoren wurden in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren immunhistochemischen Analyse bei -80°C gelagert.

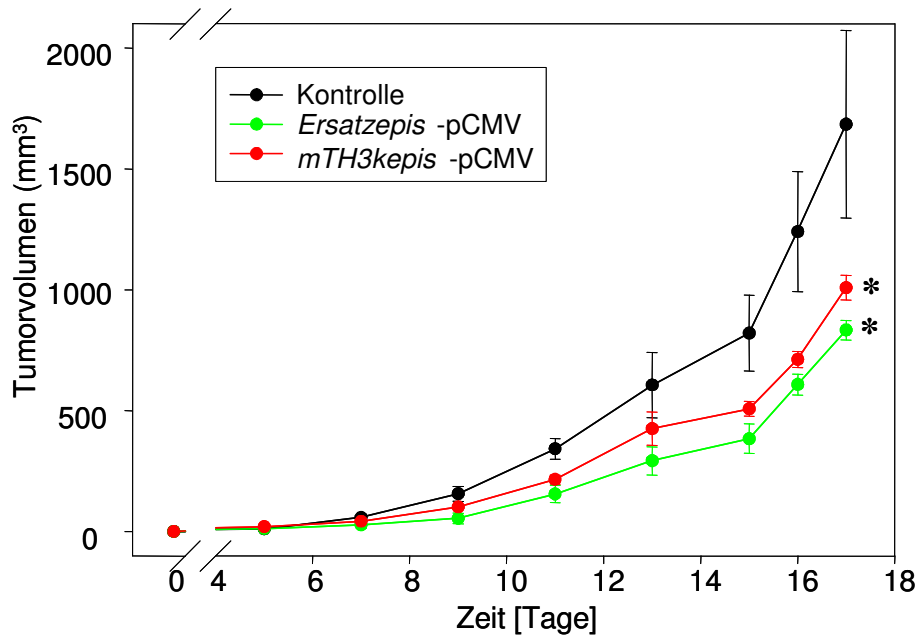


Abb. 14: Tumorstadien *in vivo* nach Impfung mit *mTH3kepis*-pCMV und *Ersatzepis*-pCMV

In der obigen Abbildung ist die anti-Tumor-Wirksamkeit der Vakzine *mTH3kepis*-pCMV (rot) und *Ersatzepis*-pCMV (grün) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (schwarz) dargestellt. Die Mäuse [n=6] der unterschiedlichen Gruppen wurden, außer der Kontrollgruppe, dreimal mit je zweiwöchigem Abstand oral mit 5×10^8 Plasmid-tragenden *S. typhimurium*-Bakterien des Stammes SL7207 geimpft. Die subkutane Tumorzellinjektion (2×10^6 Zellen pro Maus) erfolgte eine Woche nach der letzten Impfung. Nach Etablierung meßbarer Tumoren wurde das Tumorstadium protokolliert. Am 17. Tag nach Tumorzellapplikation wurden die Tumoren operativ entfernt und der weiteren Analyse zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorstadien und zugehörige Standardfehler, sowie die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den beiden behandelten Gruppen (* = $p < 0.05$).

Wie in Abbildung 14 zu erkennen, vermitteln sowohl die natürlichen, auf NXS2-Zellen in MHC-Klasse-I präsentierten Epitope (*Ersatzepis*) als auch die vorhergesagten, starken MHC-Klasse-I-Liganden aus der mTH-Sequenz (*mTH3kepis*) als DNA-Vakzine im Vektor pCMV-F3Ub eine signifikante Reduzierung des NXS2-Primärtumorstadiums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (p jeweils < 0.05). Die errechneten Tumorstadien der einzelnen Gruppen korrelieren dabei mit den nach operativer Entfernung erhaltenen Tumorgewichten. Diese sind in Abbildung 15 gezeigt.

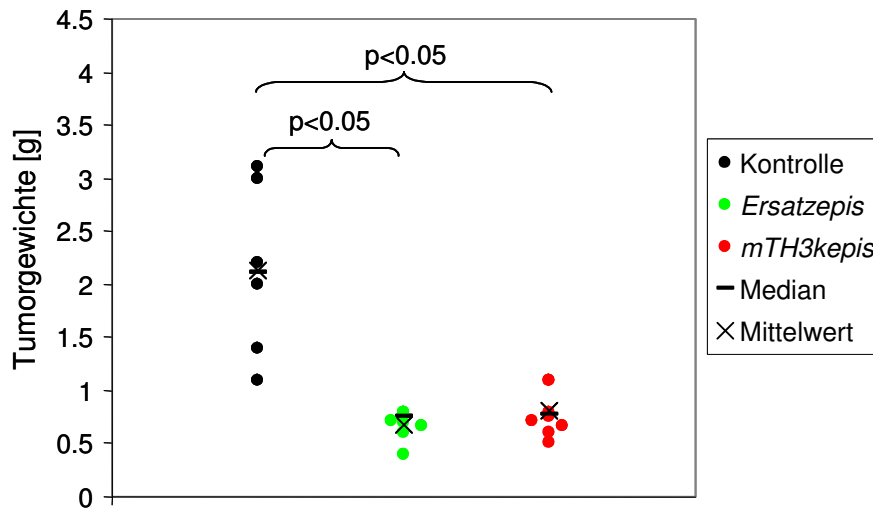


Abb. 15: Tumorgewichte *in vivo* nach Impfung mit *mTH3kepris*-pCMV und *Ersatzzepris*-pCMV

Nach der operativen Entfernung der Tumoren wurden deren Gewichte ermittelt, bevor Teile der Tumoren für spätere immunhistochemische Untersuchungen eingefroren wurden. Die Grafik zeigt den deutlichen, statistisch signifikanten Unterschied der Tumorgewichte der geimpften Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dabei unterscheiden sich die Mittelwerte und Mediane innerhalb der geimpften Gruppen nur geringfügig, was auf eine in etwa gleiche Effektivität der beiden Impfstoffe, *mTH3kepris*-pCMV und *Ersatzzepris*-pCMV, eine Anti-Tumor-Immunantwort hervorzurufen, hindeutet.

Nach ungefähr 3.5 Wochen war die Metastasierung der Lebern der Kontrollmäuse soweit fortgeschritten, daß das Experiment beendet wurde. Die Lebergewichte und der Metastasierungsgrad der Lebern wurden bestimmt. Die ermittelten Lebergewichte geben Aufschluß darüber, inwiefern die applizierten Impfstoffe auch einen Monat nach der letzten Impfung ein Metastasenwachstum verhindern, also wie effektiv sie vermochten, eine Anti-Tumorantwort zu induzieren. In Abbildung 16 sind die ermittelten Lebergewichte dargestellt, Tab. 6 gibt den prozentualen Metastasierungsgrad der Lebern in den einzelnen Gruppen wieder. Es zeigte sich, daß die beiden eingesetzten Minigene nicht nur eine Reduktion des Tumorwachstums vermittelten, sondern daß die induzierte Anti-Tumorantwort auch nach Absetzen der Impfungen vorhielt und so die Metastasierung der Lebern größtenteils vollständig verhinderte. In Abbildung 17 ist verdeutlicht, wie sehr sich die Lebern der unterschiedlichen Gruppen rein äußerlich unterscheiden. Nach histologischer Analyse der Lebern mittels H/E-Färbung konnte auch auf mikroskopischer Ebene eine Tumorzellinfiltration in den geimpften Gruppen ausgeschlossen werden, beispielhaft in Abb. 18 gezeigt.

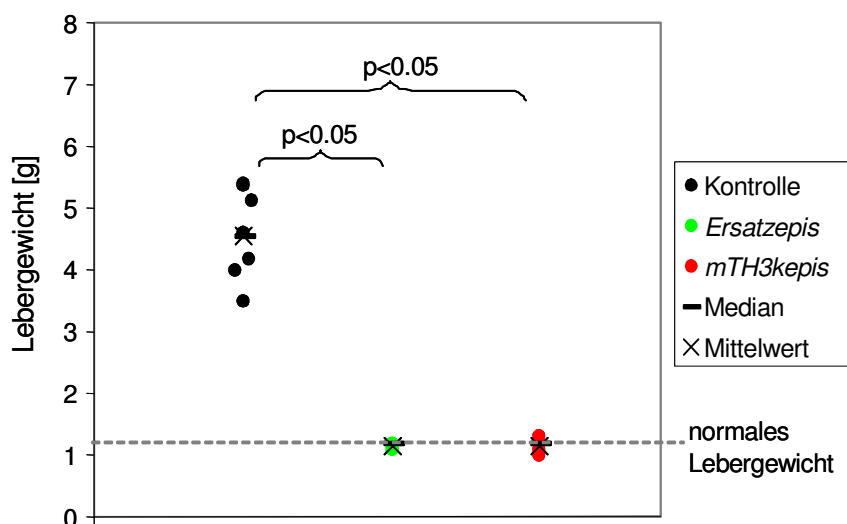


Abb. 16: Lebergewichte und Metastasierungsgrad *in vivo* nach Impfung mit *mTH3kepis*-pCMV und *Ersatzepis*-pCMV

Nach Beendigung des *in vivo*-Experiments, ca. 4 Wochen nach der letzten oralen Impfung, wurden den Mäusen nach steriler Entnahme der Milzen weitere Organe entnommen. Die Gewichte der Lebern wurden ermittelt (Abb. 16), der Metastasierungsgrad bestimmt (Tab. 6), der Befall der Leberoberfläche durch Neuroblastom-Metastasen lag dabei der Bestimmung des Metastasierungsgrads wie folgt zugrunde: 0% = 0, <20% = 1, 20-50% = 2, >50% = 3. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) im Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit einem „*“ gekennzeichnet. Das durchschnittliche Lebergewicht einer ausgewachsenen A/J-Maus liegt zwischen 1 und 1.3 g.

Tab. 6: Lebermetastasierungsgrad

Gruppe n=6	Anzahl Metastasen	Metastasierungsgrad
Kontrolle	alle >250	3, 3, 3, 3, 3, 3
<i>Ersatzepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 0, 2	0, 0, 0, 0, 0, 1 (*)
<i>mTH3kepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 2, 2	0, 0, 0, 0, 1, 1 (*)



Abb. 17: Lebergröße und Ausmaß der Metastasierung nach Impfung mit *mTH3kpi-pCMV* und *Ersatzepis-pCMV*

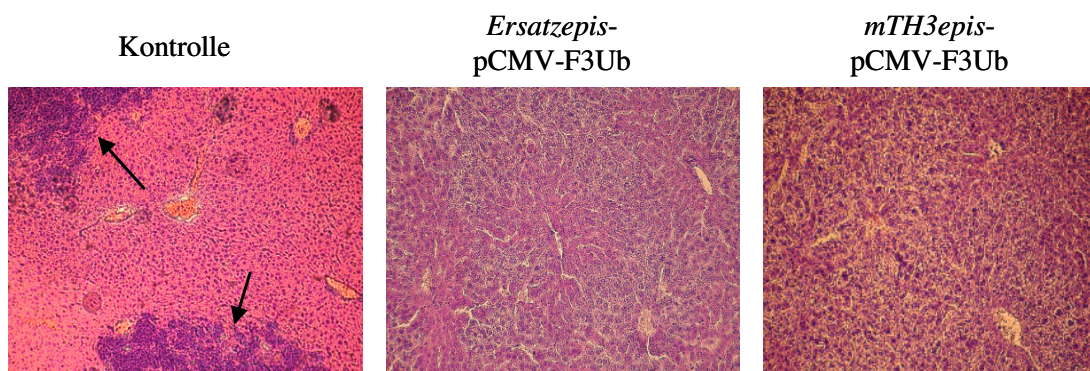


Abb. 18: Histologie der Mausebern am Ende des Mausexperiments

In Abb. 17 sind Lebern beispielhaft makroskopisch nach Entnahme am Ende eines *in vivo*-Experiments gezeigt. Auf mikroskopischer Ebene wurde eine Tumorzellinfiltration mittels histologischer H/E-Färbung ausgeschlossen, Abb. 18 (mittleres und rechtes Bild). Im linken Bild sieht man zum Vergleich NXS2-Tumorzellen, die das Lebergewebe infiltriert haben, was deutlich an den dunkelblau gefärbten Zellhaufen (schwarze Pfeile) zu erkennen ist.

3.6.2. Die putativ schwachen MHC-Klasse-I-Liganden aus der mTH-Sequenz vermitteln keine effektive Anti-Tumorantwort *in vivo*

Nachdem die *in vivo* Effektivität eines DNA-Vakzins, welches für drei putativ starke MHC-Klasse I-bindende Peptide aus der Gesamtsequenz der mTH kodiert, gezeigt werden konnte, sollte nun die Verlässlichkeit des genutzten Vorhersageprogramms *syfpeithi* für MHC-Klasse-I-Liganden weiter verdeutlicht werden. Hierzu wurde als DNA-Vakzin ein Minigen eingesetzt, welches für drei Peptide aus der mTH-Proteinsequenz kodiert, die laut Vorhersage

nicht bzw. mit nur sehr schwacher Affinität an H2-K^k, das MHC-Klasse-I-Allel in der A/J-Maus, binden: *mTHlowest*-pCMV-F3Ub. Zum Vergleich wurden zusätzlich die bereits getesteten Vakzine *mTH3kepis*- und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub *in vivo* eingesetzt.

A/J-Mäuse (n=6) wurden, wie zuvor beschrieben, dreimal mit zweiwöchigem Abstand mit *S. typhimurium*-Bakterien, welche die jeweiligen Plasmide trugen, oral geimpft. Eine Woche nach der letzten Impfung erfolgte die subkutane Injektion der Neuroblastomzelllinie NXS2 in die linke Flanke der Mäuse. Das Tumorstadium wurde in den darauffolgenden Tagen verfolgt und die Volumina mitsamt Standardabweichungen errechnet. Nach 18 Tagen wurden den Mäusen die subkutanen Tumoren in einer Operation unter Narkose entfernt, das Primärtumorgewicht bestimmt und die Mäuse über einen Zeitraum von ca. 3.5 Wochen weiterbeobachtet. Die entfernten Tumoren wurden in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

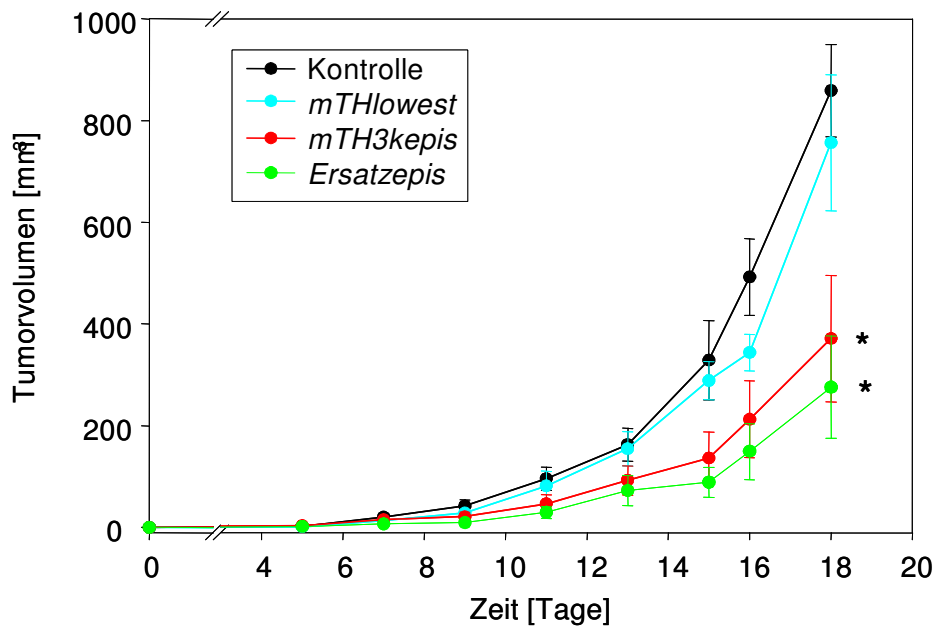


Abb. 19: Tumorstadien nach Impfung mit *mTH3kepis*-, *Ersatzepis*- und *mTHlowest*-pCMV

In der obigen Abbildung ist die Effektivität der einzelnen DNA-Vakzine, eine Anti-Tumorstadiumantwort *in vivo* zu induzieren, dargestellt. Neben der unbehandelten Kontrollgruppe (schwarz) kamen sowohl die Vakzine *mTH3kepis*-pCMV (rot) und *Ersatzepis*-pCMV (grün) wie auch der Impfstoff *mTHlowest*-pCMV (hellblau) zum Einsatz. *mTHlowest*-pCMV kodiert für drei Peptide, die laut MHC-Klasse-I-Liganden-Vorhersageprogramm *syfpeithi* nicht oder nur sehr schlecht an H2-K^k binden. Die Mäuse (n=6) wurden dreimal mit je zweiwöchigem Abstand oral mit Plasmid-tragenden *S. typhimurium*-Bakterien des Stammes SL7207 geimpft. Die subkutane Tumorstadiumzellinjektion erfolgte eine Woche nach der letzten Impfung. Am 18. Tag nach Tumorstadiumzellapplikation wurden die Tumoren operativ entfernt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorstadiumvolumina und zugehörige Standardfehler, sowie die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe bzw. der *mTHlowest*-Gruppe und den beiden anderen behandelten Gruppen (* = p<0.05).

Wie bereits zuvor gezeigt, konnten auch in diesem Experiment die Vakzine *mTH3kepis*- und *Ersatzepis*-pCMV ihre Anti-Tumorwirksamkeit zeigen. Dagegen wird deutlich, daß die putativ schwachen MHC-Klasse-I-Liganden im DNA-Vakzin *mTHlowest*-pCMV keine Reduktion des Primärtumorstwachstums hervorrufen (Abb. 19). Dies spiegelt sich auch in den nach operativer Entfernung der Tumoren ermittelten Tumorgewichten wider (Abb. 20).

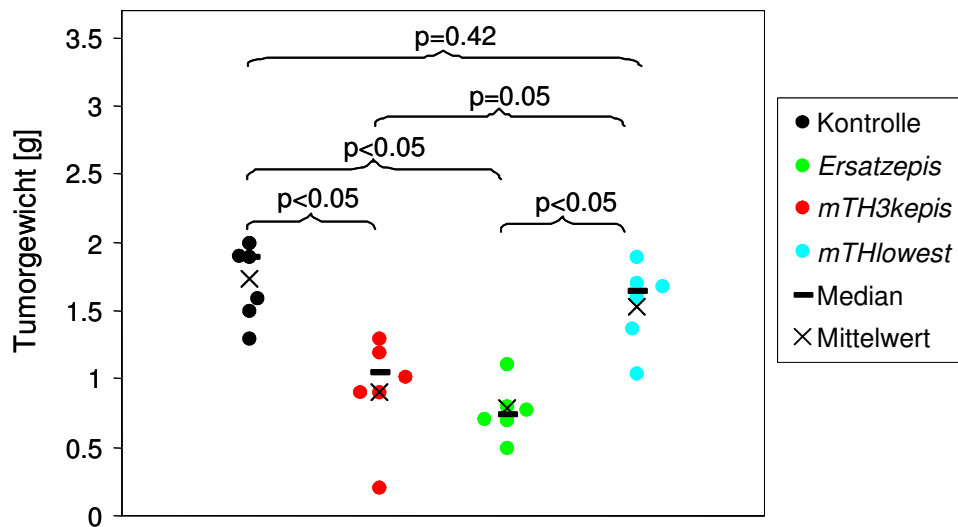


Abb. 20: Tumorgewichte *in vivo* nach Impfung mit *mTH3kepis*-pCMV, *Ersatzepis*-pCMV und *mTHlowest*-pCMV

Nach der operativen Entfernung der Tumoren wurden deren Gewichte ermittelt, bevor Teile der Tumoren für spätere immunhistochemische Untersuchungen eingefroren wurden. Die Grafik zeigt den statistisch signifikanten Unterschied der Tumorgewichte in den Gruppen *mTH3kepis* und *Ersatzepis* im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und zur Gruppe, die die schwachen H2-K^k-Epitope als Impfstoff erhielt.

Wiederum dreieinhalb Wochen nach operativer Entfernung der Tumoren wurden die Mäuse getötet und die Lebergewichte sowie der Metastasierungsgrad der Lebern ermittelt (Abb. 21). Das DNA-Vakzin, welches für putativ schwache H2-K^k-Epitope kodiert (*mTHlowest*-pCMV-F3Ub), vermochte keine andauernde Anti-Tumorantwort zu vermitteln, obwohl auf den ersten Blick eine leichte Reduzierung der Lebergewichte im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar scheint. Die stark ausgeprägte Lebermetastasierung in dieser Gruppe im Vergleich zu den zwei Gruppen, welche die Vakzine *mTH3kepis*-pCMV bzw. *Ersatzepis*-pCMV als Impfstoff erhielten, widerlegt diese Annahme jedoch (Tab. 7).

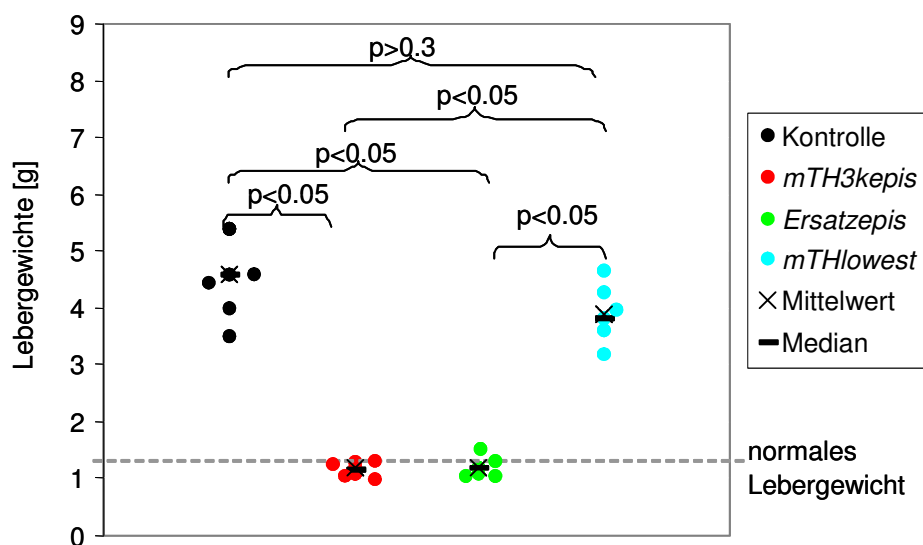


Abb. 21: Lebergewichte und Metastasierungsgrad *in vivo* nach Impfung mit *mTH3kepis*-pCMV, *Ersatzepis*-pCMV und *mTHlowest*-pCMV

Nach Beendigung des *in vivo*-Experiments wurden den Mäusen nach steriler Entnahme der Milzen weitere Organe entnommen. Die Gewichte der Lebern wurden ermittelt (Abb. 21) und der Metastasierungsgrad bestimmt (Tab. 7). Der Befall der Leberoberfläche durch Neuroblastom-Metastasen lag dabei der Bestimmung des Metastasierungsgrads wie folgt zugrunde: 0% = 0, <20% = 1, 20-50% = 2, >50% = 3. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) der Unterschiede im Metastasierungsgrad zur Kontrollgruppe und zur *mTHlowest*-pCMV-Gruppe ist mit einem „*“ gekennzeichnet. Das durchschnittliche Lebergewicht einer ausgewachsenen A/J-Maus liegt zwischen 1 und 1.3 g.

Tab. 7: Lebermetastasierungsgrad

Gruppe n=6	Anzahl Metastasen	Metastasierungsgrad
Kontrolle	alle >250	3, 3, 3, 3, 3, 3
<i>Ersatzepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 1, 1	0, 0, 0, 0, 1, 1 *
<i>mTH3kepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 0, 2	0, 0, 0, 0, 0, 1 *
<i>mTHlowest</i> -pCMV-F3Ub	5x >250 1x 150	3, 3, 3, 3, 3, 3

3.6.3. Das Minigen-Design im Vektor pCMV-F3Ub ist zwingend für eine effektive Anti-Tumorantwort *in vivo*

Nachdem die Anti-Tumor-Effektivität der *mTH3kepis* in Verbindung mit dem Vektor pCMV-F3Ub gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob die durch das Vektordesign vermittelte stabile Fusion der Minigen-Peptide an Ubiquitin und der damit verbundene proteasomale Abbau tatsächlich zwingend für eine Anti-Tumorantwort *in vivo* ist. Hierzu wurden in zwei unabhängigen *in vivo*-Experimenten die Impfstoffe *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub-WT und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub-WT eingesetzt, in denen zuvor die C-terminale AS Ala₇₆ zu Gly₇₆ rückmutiert und somit die Wildtyp-Sequenz des Ubiquitins wiederhergestellt wurde. Wie bereits zuvor gezeigt wurde, ist die Halbwertszeit und somit die Stabilität eines WT-Ubiquitin-Fusionspeptids um ein Vielfaches verringert im Vergleich zum mutierten Ubiquitin-Fusionspeptid (Ecker *et al.* 1989), s. dazu auch Abschnitt 1.5. der Einleitung.

Als Vergleich wurden die bereits getesteten Impfstoffe *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub *in vivo* eingesetzt. A/J-Mäuse (n=6) wurden, wie zuvor beschrieben, dreimal mit zweiwöchigem Abstand mit *S. typhimurium*-Bakterien, die die jeweiligen Plasmide trugen, oral geimpft. Eine Woche nach der letzten Impfung erfolgte die subkutane Injektion der Neuroblastomzelllinie NXS2. Das Tumorstadium wurde in den darauffolgenden Tagen verfolgt und die Volumina mitsamt Standardabweichungen errechnet. Nach 14 Tagen wurden den Mäusen die subkutanen Tumoren in einer Operation unter Narkose entfernt, das Tumorgewicht bestimmt und die Mäuse über einen Zeitraum von ca. 3.5 Wochen weiter beobachtet. Die entfernten Tumoren wurden in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren immunhistochemischen Analyse bei –80°C gelagert.

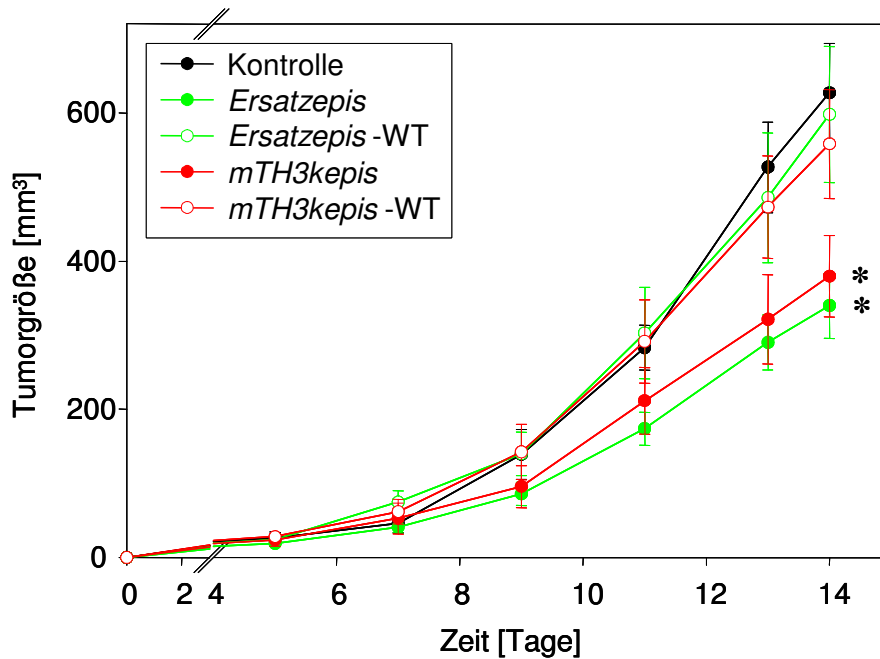


Abb. 22: Auswirkung der Destabilisierung der Ubiquitinbindung an die Minigenpeptide auf das Tumorstadium *in vivo*

In der obigen Abbildung ist die Auswirkung einer Destabilisierung der Ub-Minigen-Fusion auf die Anti-Tumorstadium der einzelnen Impfstoffe dargestellt. Dazu wurde die C-terminale AS des Ub-Gens im Vektor pCMV-F3Ub Ala₇₆ zu der Wildtypvariante Gly₇₆ rückmutiert. In diesem Experiment kamen sowohl die Vakzine *mTH3kepis*-pCMV (rote, geschlossene Kreise) und *Ersatzepis*-pCMV (grüne, geschlossene Kreise) als auch die jeweils korrespondierenden Minigene im WT-Plasmid pCMV-F3Ub-WT zum Einsatz: *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub-WT (rote, offene Kreise) und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub-WT (grüne, offene Kreise). Desweiteren wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführt (schwarz). Die Mäuse der unterschiedlichen Gruppen [n=6] wurden, außer der Kontrollgruppe, dreimal mit je zweiwöchigem Abstand oral mit 5×10^8 Plasmid-tragenden *S. typhimurium*-Bakterien des Stammes SL7207 geimpft. Die subkutane Tumorzellinjektion (2×10^6 Zellen pro Maus) erfolgte eine Woche nach der letzten Impfung. Am 14. Tag nach Tumorzellapplikation wurden die Tumoren operativ entfernt und der weiteren Analyse zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorstadium und zugehörige Standardfehler.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, hat die instabilere Fusion des Ub an die Minigenpeptide, kodiert durch das Plasmid pCMV-F3Ub-WT, einen deutlich negativen Einfluß auf die Effektivität der Minigene *mTH3kepis* sowie *Ersatzepis*, in den A/J-Mäusen eine Anti-Tumorstadium zu induzieren. In beiden, mit dem WT-Plasmid geimpften Gruppen findet eine nur sehr geringe Reduktion des Tumorstadiums statt, die Tumorstadiumsrate ist nahezu identisch mit der in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dagegen wird ebenso der Unterschied zu den bereits getesteten Impfstoffen *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub sowie

Ersatzepis-pCMV-F3Ub deutlich, die auch in diesem Experiment ein verlangsamtes Tumorstadium induzieren. Die Tumorstadien der *mTH3kepis*- und der *Ersatzepis*-pCMV-Gruppe sind zur Kontrollgruppe mit einem p-Wert von $p < 0.05$ statistisch signifikant. Die unterschiedlichen Tumorstadien der Minigen-Vakzine im pCMV-F3Ub-Vektor weisen zu denen im jeweiligen mutierten Vektor p-Werte von $p < 0.1$ auf.

Dieses Ergebnis spiegelt sich noch deutlicher in den Tumorgewichten wider, die nach operativer Entfernung ermittelt wurden (Abb. 23). Hier sind die Minigen-pCMV-Gruppen sowohl zur Kontrollgruppe als auch zu den jeweils zugehörigen mutierten pCMV-Gruppen statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0.005$), während die mutierten pCMV-Gruppen sowohl untereinander als auch zur Kontrollgruppe p-Werte von $p > 0.2$ aufweisen.

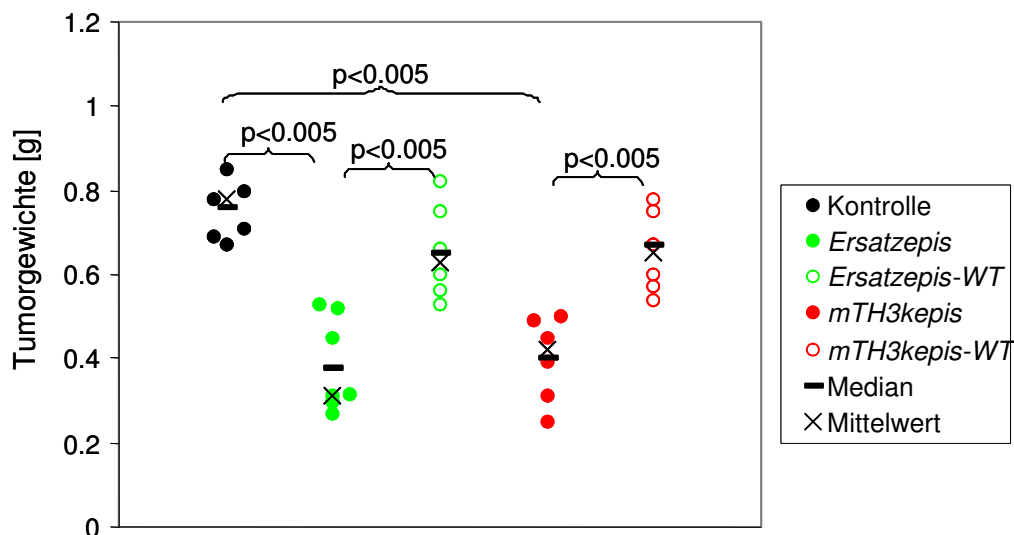


Abb. 23: Tumorgewichte nach Impfung mit *mTH3kepis*-pCMV-F3Ub und *Ersatzepis*-pCMV-F3Ub sowie den jeweils korrespondierenden Minigen-WT-Plasmiden

Nach der operativen Entfernung der Tumoren wurden deren Gewichte ermittelt, bevor Teile der Tumoren für spätere immunhistochemische Untersuchungen eingefroren wurden. Diese Abbildung zeigt den deutlichen, statistisch signifikanten Unterschied der Tumorgewichte in den Gruppen *mTH3kepis* (rote, geschlossene Kreise) und *Ersatzepis* (grüne, geschlossene Kreise) im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Plasmidgruppen *mTH3kepis*-pCMV-WT (rote, offene Kreise) und *Ersatzepis*-pCMV-WT (grüne, offene Kreise) und zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Etwa dreieinhalb Wochen nach operativer Entfernung der subkutanen Tumoren wurde das Experiment beendet und den Mäusen u.a. die Leber entnommen, um das Gewicht (Abb. 24 A) und den Metastasierungsgrad (Abb. 24 B) zu bestimmen. Aus den dargestellten

Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Minigene in den WT-Plasmiden keinen anhaltenden, anti-tumoralen Effekt *in vivo* auslösen, was nur mit der Destabilisierung der Ub-Peptidfusion zu erklären ist, da die korrespondierenden DNA-Vakzine *mTH3kepis*-pCMV und *Ersatzepis*-pCMV auch in diesem Experiment eine Metastasierung in die Lebern weitestgehend verhinderten. Die mutierten pCMV-Gruppen weisen sowohl untereinander als auch zur Kontrollgruppe p-Werte von $p > 0.5$ auf.

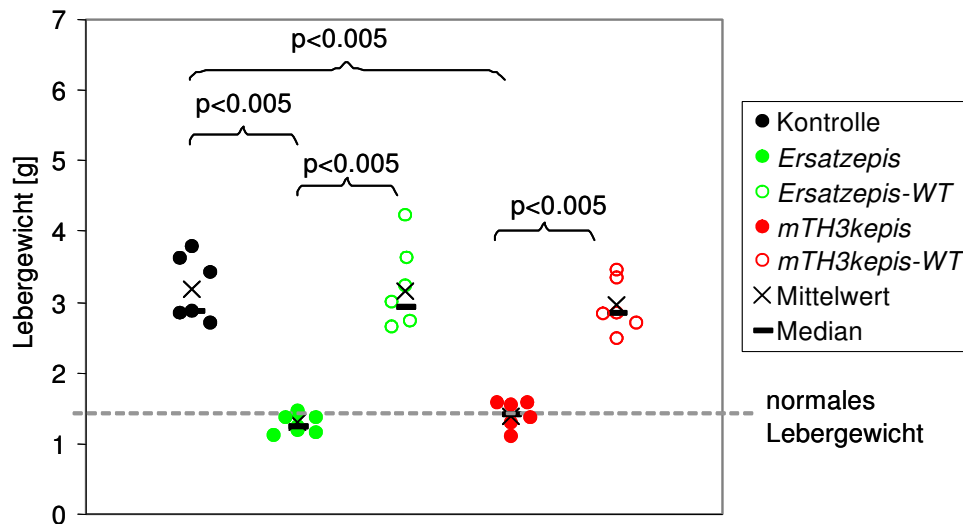


Abb. 24: Lebergewichte und Metastasierungsgrad *in vivo* nach Impfung mit *mTH3kepis*-pCMV, *Ersatzepis*-pCMV und den korrespondierenden Minigenen im WT-Plasmid pCMV-WT

Nach Beendigung des *in vivo*-Experiments wurden den Mäusen die Lebern entnommen und deren Gewichte (oben) sowie der Metastasierungsgrad bestimmt (Tab. 8). Der Befall der Leberoberfläche durch Neuroblastom-Metastasen lag dabei der Bestimmung des Metastasierungsgrads wie folgt zugrunde: 0% = 0, <20% = 1, 20-50% = 2, >50% = 3. Die Metastasierungsgrade der *Ersatzepis*-pCMV und der *mTH3kepis*-pCMV-Gruppe sind statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$) zu den anderen Gruppen („*“). Das durchschnittliche Lebergewicht einer ausgewachsenen A/J-Maus liegt zwischen 1 und 1.3 g.

Tab. 8: Lebermetastasierungsgrad

Gruppe (n=6)	Anzahl Metastasen	Metastasierungsgrad
Kontrolle (n=5)	alle >250	3, 3, 3, 3, 3
<i>Ersatzepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 2, 3	0, 0, 0, 0, 1, 1 *
<i>Ersatzepis</i> -pCMV-WT	4x >250, 2x 100	3, 3, 3, 3, 3, 3
<i>mTH3kepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 1, 2	0, 0, 0, 0, 1, 1 *
<i>mTH3kepis</i> -pCMV-WT	4x >250, 1x 150, 1x 100	3, 3, 3, 3, 3, 3

3.7. Die durch die DNA-Vakzine induzierte Anti-Tumorantwort *in vivo* wird durch zytotoxische CD8⁺T-Zellen vermittelt

Beide *in vivo* eingesetzten DNA-Vakzine im Vektor pCMV-F3Ub vermochten eine anhaltende Anti-Tumorantwort zu induzieren. Das Vektordesign sowie die Auswahl der Peptide, für die die Minigen-DNAs kodieren, soll *in vivo* einen proteasomalen Abbau der Minigen-Peptide und eine Aktivierung zytotoxischer CD8⁺T-Zellen induzieren, die die NXS2-Zellen spezifisch erkennen. Um nachzuweisen, daß die antitumorale Immunantwort tatsächlich von zytotoxischen CD8⁺T-Zellen vermittelt wird, wurden Gefrierschnitte von den operativ entfernten, subkutanen Tumoren angefertigt und diese immunhistochemisch auf eine Infiltration von CD8⁺T-Zellen hin untersucht. Zusätzlich wurden die Tumoren auf infiltrierende CD4⁺T-Zellen hin überprüft.

Eine weitere Möglichkeit, eine zytotoxische T-Zell-Antwort nachzuweisen, ist die Anwendung eines Zytotoxizitätsassays mit radioaktivem Chrom 51 (Cr51). Hierzu wurden nach einem beendeten *in vivo*-Experiment unter sterilen Bedingungen die Milzen der Mäuse entfernt und die darin enthaltenen Lymphozyten in ihrer Gesamtheit isoliert. Nach einer fünftägigen Reaktivierung mit IL-2 und NXS2-Zellen *in vitro* wurden die Zellen in Zytotoxizitätsassays eingesetzt, wobei NXS2-Zellen als Zielzellen (*target*) dienten. Zum Ausschluss einer NK-Zell-Aktivität wurden die NK-sensitiven YAC-1-Zellen ebenfalls als Zielzellen mitgeführt.

Während der vor einem Zytotoxizitätsassay durchgeführten fünftägigen Inkubationsphase der Milzzellen mit IL-2 und NXS2-Zellen wurden Überstände aus den Zellkulturen entnommen

und diese auf einen Anstieg der IFN- γ -Produktion hin untersucht, was auf eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen hindeutet.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zum Nachweis einer durch CD8⁺T-Zellen vermittelten Immunantwort dargestellt. Dabei wird auf eine Darstellung der Ergebnisse der anderen DNA-Vakzine (*mTHlowest*-pCMV, *mTH3kepis*-pCMV-WT und *Ersatzepis*-pCMV-WT) betreffend, verzichtet, da sie *in vivo* keine Wirkung gezeigt hatten. Zum besseren Verständnis und der Einfachheit halber werden ab jetzt die mit *mTH3kepis*-pCMV und *Ersatzepis*-pCMV behandelten Gruppen als „geimpfte“ Gruppen bezeichnet, die unbehandelte Kontrollgruppe weiterhin als „Kontrolle“.

3.7.1. Infiltration der Tumoren durch CD8⁺T-Zellen nach DNA-Vakzinierung

Gefrierschnitte von subkutanen Tumoren wurden immunhistochemisch auf eine CD8⁺T-Zellinfiltration hin untersucht, außerdem wurden die einwandernden CD4⁺T-Zellen quantifiziert. In Abb. 25 sind repräsentative Aufnahmen solcher infiltrierter Tumoren aus den geimpften Mausgruppen gezeigt. Der Unterschied wird deutlich im Vergleich zu Tumoren der Kontrollgruppe, wo keine oder nur sehr wenige CD8⁺T- und CD4⁺T-Zellen in den Tumor eingewandert sind. Um eine quantitative Aussage über den Anstieg der CD8⁺T- und der CD4⁺T-Zellinfiltration in den geimpften Gruppen machen zu können, wurden von je 6 Tumoren pro Mausgruppe Gefrierschnitte angefertigt und die infiltrierenden T-Zellen mit einer 400fachen Vergrößerung in 10 Sichtfeldern ausgezählt (Abb. 26). Es ist in beiden geimpften Gruppen eine erhöhte Anzahl an tumorinfiltrierenden T-Zellen zu finden, wobei auch ein großer Anstieg der einwandernden CD4⁺T-Zellen beobachtet werden konnte.

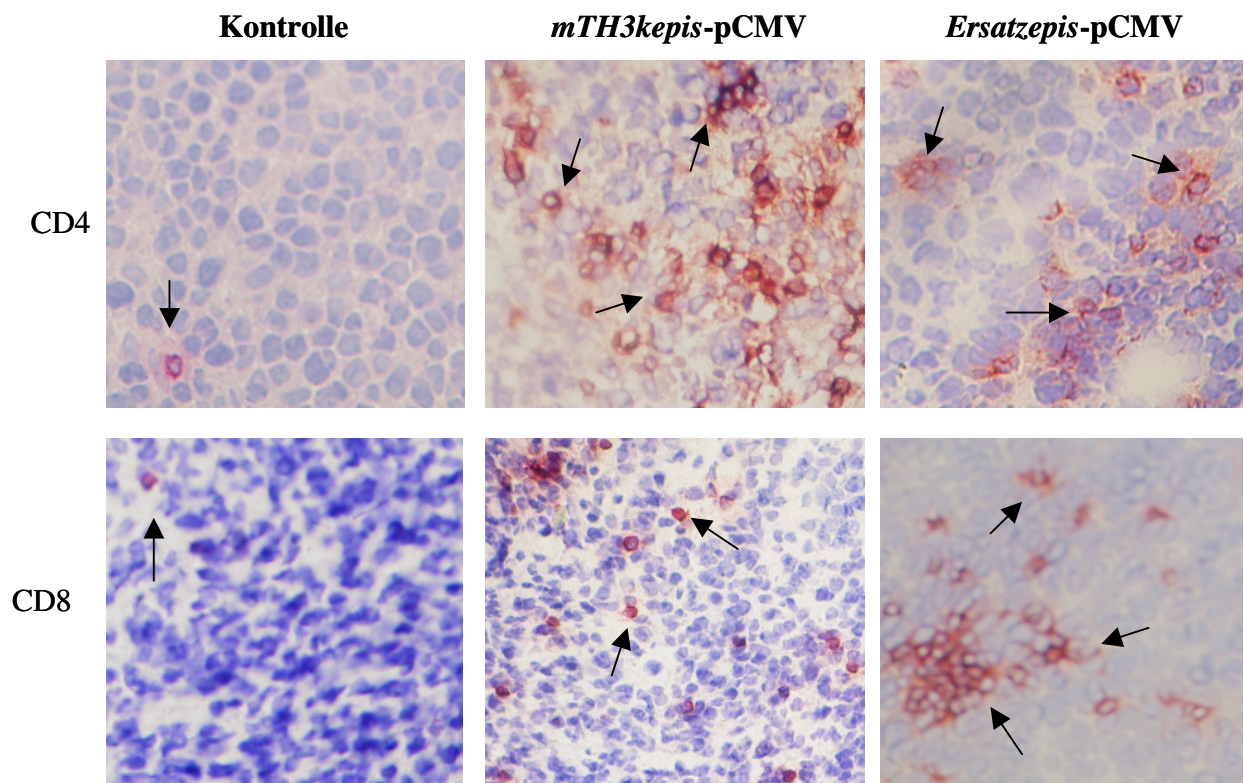


Abb. 25: Tumordinfiltrierende T-Lymphozyten nach DNA-Vakzinierung

Was in Abb 26 graphisch dargestellt ist, zeigen diese Aufnahmen im Bild. Von Tumoren geimpfter Mäuse wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese immunhistochemisch auf infiltrierende T-Zellen hin untersucht (schwarze Pfeile). Links: Tumoren aus der Kontrollgruppe, Mitte: Tumoren aus der *mTH3kepis*-pCMV-Gruppe, Rechts: Tumoren aus der *Ersatzepis*-pCMV-Gruppe.

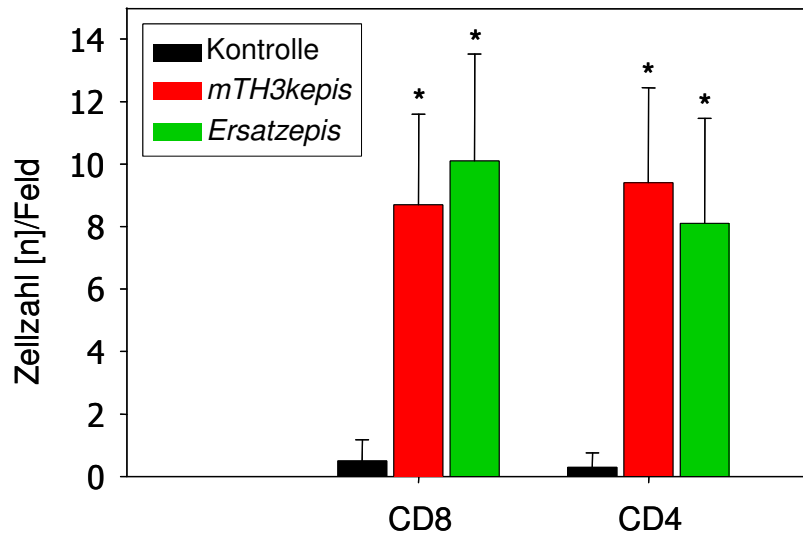


Abb. 26: Anzahl tumorinfiltrierender T-Lymphozyten nach DNA-Vakzinierung

Die Induktion einer Anti-Tumorantwort *in vivo* wurde mittels Immunhistochemie überprüft. Hierzu wurden Gefrierschnitte von Tumoren operierter Mäuse angefertigt und die infiltrierenden CD4⁺- sowie CD8⁺-Zellen angefärbt. Die Anzahl tumorinfiltrierender Zellen wurde durch Auszählen der Zellen in 10 Feldern bei einer 400fachen Vergrößerung von 6 Tumoren pro Mausgruppe quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kontrolle (schwarz), der *Ersatzepis*-pCMV- (grün) und der *mTH3kepis*-pCMV-Gruppe (rot), samt der Standardabweichungen. Sternchen (*) zeigen, daß die Unterschiede in den ermittelten Zellzahlen aus den geimpften Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant sind ($p < 0.005$).

3.7.2. IFN- γ -Produktion von Milzzellen der geimpften Mäuse

Als weiteres Zeichen für eine Aktivität zytotoxischer CD8⁺T-Lymphozyten dient der Nachweis einer Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interferon- γ . Hierzu wurden Splenozyten am Ende eines Vakzinierungsexperiments nach Isolierung aus Milzen für 5 Tage zusammen mit durch Bestrahlung inaktivierten NXS2-Zellen und 100 IE IL-2 als zusätzliche Stimulanz kultiviert. Täglich wurden Überstände aus den Zellkulturflaschen entnommen und später die Konzentration an IFN- γ zu den verschiedenen Zeitpunkten in einem ELISA gemessen. Die NXS2-Zellen sollten dabei aufgrund der an ihrer Oberfläche exprimierten Antigene spezifisch von CD8⁺T-Lymphozyten der zuvor geimpften Mäuse erkannt werden, diese aktivieren und sie somit zur Produktion des Zytokins IFN- γ anregen. In Abb. 27 ist die IFN- γ -Produktion an den Tagen 3, 4 und 5 nach Präparation der Splenozyten dargestellt. Es ist eine deutliche Steigerung der IFN- γ -Konzentration in den geimpften Gruppen zu erkennen, wohingegen die IFN- γ -Produktion in der Kontrollgruppe

zwar auch ansteigt, aber in wesentlich geringerem Maße als in den beiden anderen Gruppen. Dies kann auf eine Stimulation der in der Splenozyten-Population enthaltenen APCs durch das dem Medium zugesetzte IL-2 zurückgeführt werden. Es wurde in dem Diagramm auf die Darstellung der IFN- γ -Konzentrationen an den ersten beiden Tagen nach Präparation verzichtet, da diese unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte *in vivo*-Experimente.

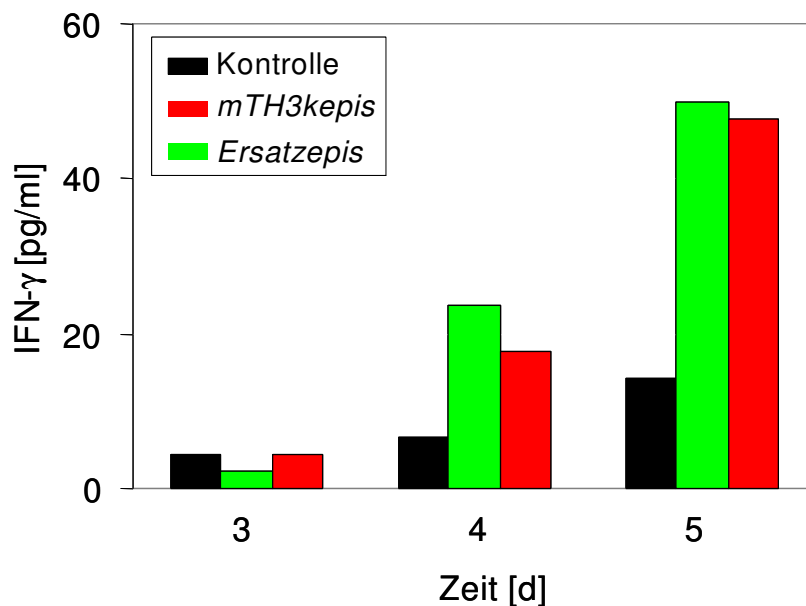


Abb. 27: IFN- γ -Produktion von Splenozyten geimpfter Mäuse *ex vivo* nach Stimulation mit NXS2 und IL-2

Die nach Beendigung eines *in vivo*-Experiments isolierten Splenozyten wurden für 5 Tage unter Zugabe von 100 IU IL-2/ml bei 37°C und 5% CO₂ in T-Zell-Medium kultiviert. Desweiteren wurden den Ansätzen *target*-Zellen (durch mit 50 Gy Bestrahlung inaktivierte NXS2-Zellen) im Verhältnis 100:1 (Splenozyten:NXS2) zugefügt, um die in den Ansätzen befindlichen CD8⁺T-Lymphozyten zur IFN- γ -Produktion anzuregen. An jedem Tag wurden den Ansätzen jeweils 300 μ l Medium entnommen, die darin befindlichen Zellen abzentrifugiert und die Überstände bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. IFN- γ wurde mit Hilfe eines ELISA-Kits unter Verwendung einer Standardreihe und entsprechenden Negativkontrollen nachgewiesen. Dargestellt sind die nachgewiesenen IFN- γ -Konzentrationen an Tag 3, 4 und 5 in der Kontrollgruppe (schwarz), den *Ersatzepis* (grün) und den *mTH3kepis* (rot).

3.7.3. Durch CD8⁺T-Zellen vermittelte Lyse von NXS2-Zellen *in vitro*

Mit den am Ende eines Vakzinierungsexperiments isolierten Splenozyten wurden Zytotoxizitätsassays unter Verwendung von Cr51 durchgeführt. Als Zielzellen (*target*=T) dienten hier die gleichen Tumorzellen, wie sie im *in vivo*-Versuch zuvor verwendet wurden, NXS2. Die Splenozyten wurden nach einer fünftägigen Inkubation mit IL-2 und Stimulation mit durch Strahlung inaktivierten NXS2-Zellen als Effektorzellen (E) in einem *Cr-release-assay* in den E:T-Verhältnissen 25:1, 50:1 und 100:1 eingesetzt. In Abb. 28 A) ist ein repräsentatives Ergebnis eines Assays, in dem die prozentuale Zytotoxizität der Splenozyten aus den beiden geimpften Gruppen und der Kontrollgruppe gegenüber NXS2-Zellen dargestellt ist. Deutlich wird hier, daß sowohl die *Ersatzepis* als auch die *mTH3kepis* eine Immunität gegenüber NXS2-Zellen induzieren, die zu einer Lyse der *target*-Zellen durch Splenozyten *ex vivo* führt. Dabei steigt die spezifische Lyse mit steigender Anzahl an Effektorzellen von ca. 10% (E:T=25:1) auf bis zu 22% (E:T=100:1, *Ersatzepis*) an. Erkennbar ist auch eine etwas niedrigere Zytotoxizität der *mTH3kepis*-Splenozyten gegenüber NXS2 als sie von den *Ersatzepis*-Splenozyten vermittelt wird, besonders deutlich ist dieser Unterschied beim E:T-Verhältnis 100:1.

Um eine Lyse der NXS2-Zellen durch in der Splenozytensuspension befindliche NK-Zellen auszuschließen, wurde parallel ein Zytotoxizitätsassay mit NK-Zell-sensitiven YAC-1-Zellen unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Wie in Abb. 28 B) gezeigt, konnte keine zytolytische Aktivität der Splenozyten gegenüber YAC-1-Zellen gezeigt werden; desweiteren gibt es keine Unterschiede unter den jeweiligen Gruppen. Abb. 28 B) ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen *in vivo*-Experimenten.

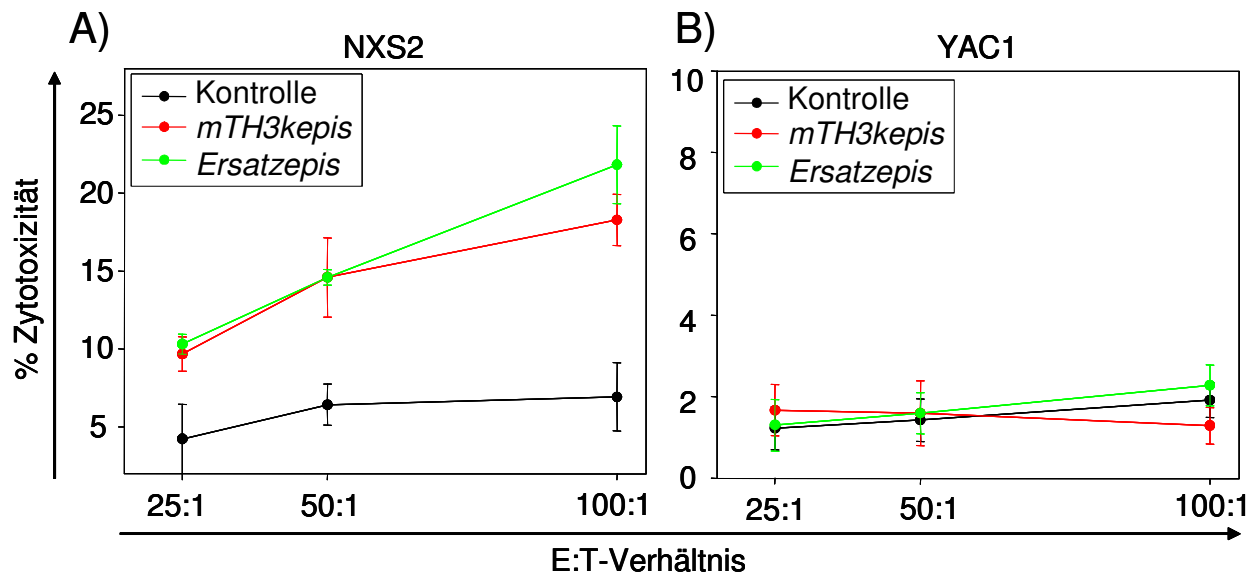


Abb. 28: Ex vivo-Zytotoxizität von Splenozyten geimpfter Mäuse gegenüber NXS2-Zellen

In Abb. 28 ist die *ex vivo*-Zytotoxizität von Splenozyten geimpfter Mäuse gegenüber NXS2 (A)- und YAC1-Zellen (B) dargestellt (rot: *mTH3kepis*-pCMV, grün: *Ersatzepis*-pCMV, schwarz: Kontrolle). Um diese zu messen, wurden mit Cr51 beladene *target*-Zellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen mit Splenozyten versetzt, die zuvor für fünf Tage mit IL-2 und inaktivierten NXS2-Zellen stimuliert wurden. Nach 4 h wurden die Überstände gesammelt und die freigesetzte Cr51-Menge mit einem γ -Counter erfasst.

3.8. Spezifität der Erkennung durch CD8⁺T-Zellen

Um abschließend den Beweis zu erbringen, daß die aus der mTH-Proteinsequenz ausgewählten vorhergesagten T-Zell-Epitope tatsächlich für eine Induktion einer gegen NXS2 gerichteten Immunantwort verantwortlich sind, wurde eine Nicht-Neuroblastom-Zelllinie (Mamma-Karzinom SCK) aus der A/J-Maus mit den drei *mTH3kepis*-Peptiden gepulst und anschließend in einem Zytotoxizitätsassay als *target* eingesetzt. Hierbei wurden die aus einem oben beschriebenen Vakzinierungsexperiment stammenden Splenozyten als Effektorzellen eingesetzt und die Lyse anhand der Cr51-Freisetzung quantifiziert.

Um eine Aussage über eine mTH-spezifische Lyse machen zu können, mußte sichergestellt werden, daß SCK-Zellen nicht eine eigene mTH-Expression aufweisen. Dazu wurde RNA aus SCK- und aus NXS2-Zellen isoliert, eine cDNA-Synthese durchgeführt und dann mittels RT-PCR die Expression von muriner TH nachgewiesen. Als Kontrolle wurde die Expression von mGAPDH verwendet (Spuren 1 und 2, Größe 360 bp). Wie in Abb. 29 A zu erkennen,

sind SCK-Zellen mTH-defizient (Spur 3), bei NXS2-Zellen tritt dagegen ein deutliches Signal bei rund 400 bp auf (Spur 4).

Nachdem die mTH-Expression in SCK-Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurde die Expression von MHC-Klasse I (H2-K^k) durchflußzytometrisch untersucht. Es ist deutlich zu erkennen, daß SCK-Zellen H2-K^k auf ihrer Oberfläche exprimieren, sogar in größerer Anzahl als die im *in vivo*-Versuch verwendeten NXS2-Zellen (Abb. 29 B).

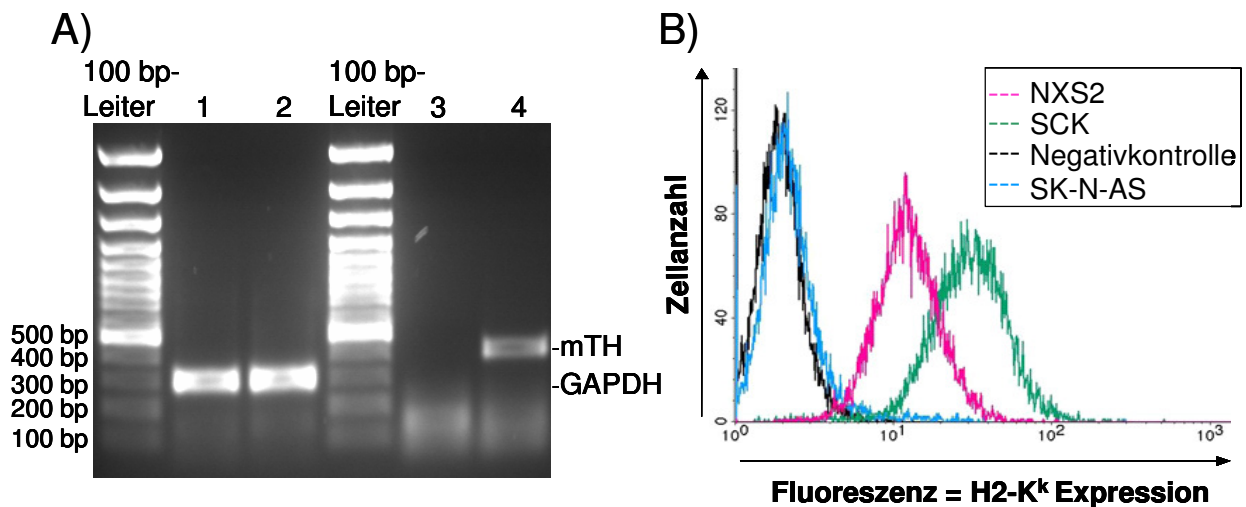


Abb. 29: mTH-Defizienz und MHC-Klasse-I-Expression von SCK-Zellen

A) Aus SCK- sowie NXS2-Zellen wurde mRNA isoliert, eine cDNA-Synthese durchgeführt und anschließend eine PCR zum Nachweis der mTH sowie der mGAPDH als Kontrollgen durchgeführt. Dargestellt ist die mGAPDH-Expression in SCK- (Spur 1) und in NXS2-Zellen (Spur 2). Die RT-PCR mit mTH-spezifischen Primern ist in Spur 3 für SCK-Zellen und in Spur 4 für NXS2 dargestellt. Als Größenstandard diente eine 100 bp-Leiter. In B) ist die hohe H2-K^k-Expression auf der Zelloberfläche der Mamma-Karzinom-Zelllinie SCK aus der A/J-Maus dargestellt. SCK-Zellen (grün) wurden dafür mittels Durchflußzytometrie unter Verwendung eines anti-H2-K^k-Antikörpers untersucht. Als Positivkontrolle und zum Vergleich der Expressionsstärke wurden NXS2-Zellen (rosa) eingesetzt, als Negativkontrollen dienten die humane Neuroblastomzelllinie SK-N-AS (blau) und NXS2-Zellen ohne Antikörper (schwarz).

Nachdem alle Voraussetzungen erfüllt waren, konnten die SCK-Zellen mit den drei *mTH3kepis*-Peptiden (FETF EAKI, EERDGN AV, VEYTK EEI) beladen werden. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Strategien ausgetestet: Elektroporation der Zellen mit den Peptiden und *pulsing* in Form einer über-Nacht-Inkubation der Zellen mit den drei Peptiden

in Zellkulturmedium. Es stellte sich heraus, daß das *pulsing* die effektivere Methode darstellte, deshalb wird auf die Elektroporation an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Das *pulsing* basiert auf der Erkenntnis, daß Zellen mit MHC-Klasse-I-Expression nach einer Inkubation mit Peptiden in der Lage sind, diese durch spontane Anlagerung „von außen“ in MHC-Klasse-I-Komplexen zu präsentieren (Kubitscheck *et al.* 1992), (Rodriguez *et al.* 1999). Da die Peptide in reiner Form vorlagen, wurde auf eine Quantifizierung der Peptid/H2-K^k-Bindung verzichtet. Als Kontrolle für eine Peptidanlagerung im Folgenden *Cr-release-assay* dienten unbehandelte SCK-Zellen, die somit keiner Lyse durch die aus den Impfxperimenten gewonnenen zytotoxischen CD8⁺T-Zellen ausgesetzt sein sollten.

In Abb. 30A ist dargestellt, wie sich Splenozyten der einzelnen Mausgruppen, Kontrollgruppe, *mTH3kepis*-Gruppe und *Ersatzepis*-Gruppe, gegenüber unbehandelten SCK-Zellen (SCK0) verhalten: es findet in keiner Gruppe eine Lyse der SCK-Zellen statt.

Wenn mit den drei *mTH3kepis*-Peptiden inkubierte SCK-Zellen (SCKp) als Zielzellen im Zytotoxizitätsassay eingesetzt werden, ändert sich das Bild: Splenozyten aus den mit *mTH3kepis*-pCMV geimpften Mäusen induzieren eine Lyse der Nicht-Neuroblastom-Zellen, während die Splenozyten aus der *Ersatzepis*- sowie der Kontrollgruppe keine derartige Aktivität aufweisen (Abb. 30B). Dies zeigt, daß Mäuse, die mit dem DNA-Vakzin *mTH3kepis*-pCMV geimpft wurden, tatsächlich zytotoxische T-Zellen bilden, die spezifisch die drei *mTH3kepis*-Peptide auf der Oberfläche von Zielzellen erkennen und die Zielzellen zu lysieren vermögen.

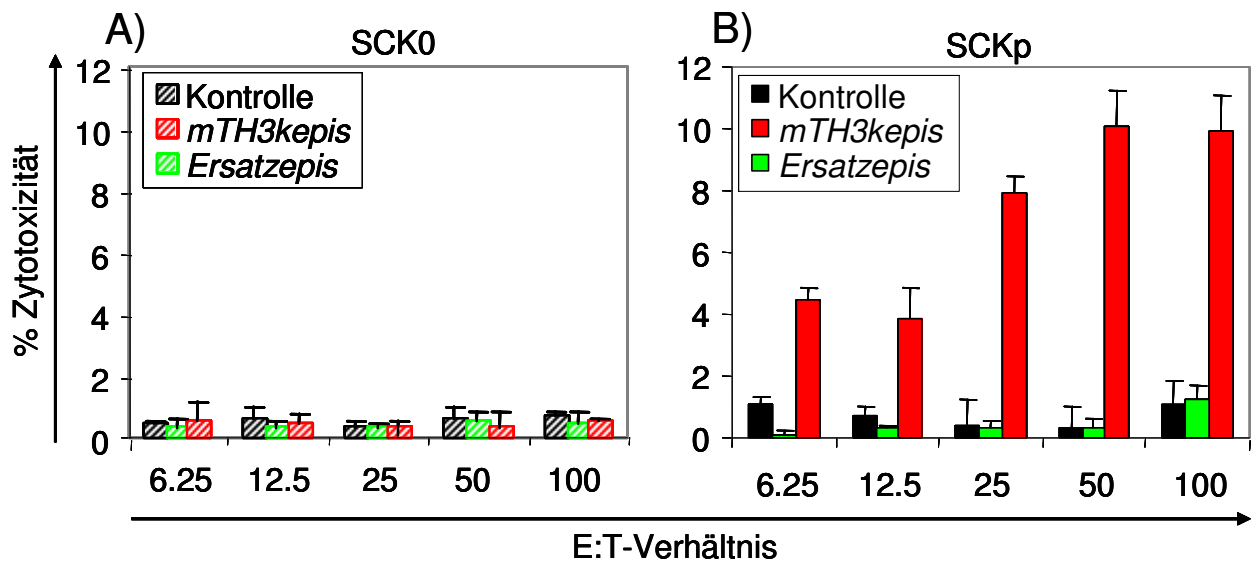


Abb. 30: Spezifische Zytotoxizität von Splenozyten geimpfter Mäuse

Nach einem beendeten Vakzinierungsexperiment, in dem die Mäuse mit den Plasmiden *mTH3kepis*-pCMV bzw. *Ersatzepis*-pCMV geimpft wurden, erfolgte die Isolierung und Stimulation von Splenozyten für fünf Tage wie zuvor beschrieben. Anschließend wurde ein Zytotoxizitätsassay mit Cr51 durchgeführt, in dem die Splenozyten als Effektorzellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen eingesetzt wurden. In Abbildung 30 A ist die Zytotoxizität von Splenozyten der Gruppen *Ersatzepis* (grün gestrichelt), *mTH3kepis* (rot gestrichelt) und der Kontrollgruppe (schwarz gestrichelt) gegenüber unbehandelten SCK-Zellen mitsamt der Standardabweichung dargestellt. In Abbildung 30 B ist die Zytotoxizität von Splenozyten der Gruppen *Ersatzepis* (grün), *mTH3kepis* (rot) und der Kontrollgruppe (schwarz) gegenüber den gepulsten SCK-Zellen mitsamt der Standardabweichung gezeigt.

3.9. Untersuchung auf Autoimmunphänomene

Eine Immunantwort, die gegen Selbstantigene gerichtet ist, birgt die Gefahr, eine gegen gesunde Körperzellen gerichtete Reaktion zu vermitteln, die ebenfalls das betreffende AG exprimieren. Im Falle der TH trifft dies für Zellen zu, die in irgendeiner Form an der Katecholaminbiosynthese beteiligt sind. Um zu testen, ob die durch die DNA-Vakzine *mTH3kepis* und *Ersatzepis* induzierten CTLs Autoimmunität auslösen, wurden die Nebennieren, als die Hauptproduzenten verschiedenster Katecholamine, von geimpften Mäusen auf eine Infiltration von CD8⁺T-Zellen hin untersucht. In Abbildung 31 sind zum Vergleich immunhistochemische Färbungen der Nebennieren mit anti-CD8 (A) und als Positivkontrolle mit anti-TH-Antikörper (B) gezeigt. Es konnte kein Unterschied in der

Infiltration durch CTLs zwischen Nebennieren der Kontrollgruppen und denen der mit *mTH3epis*- und *Ersatzepis*-pCMV geimpften Mäuse festgestellt werden.

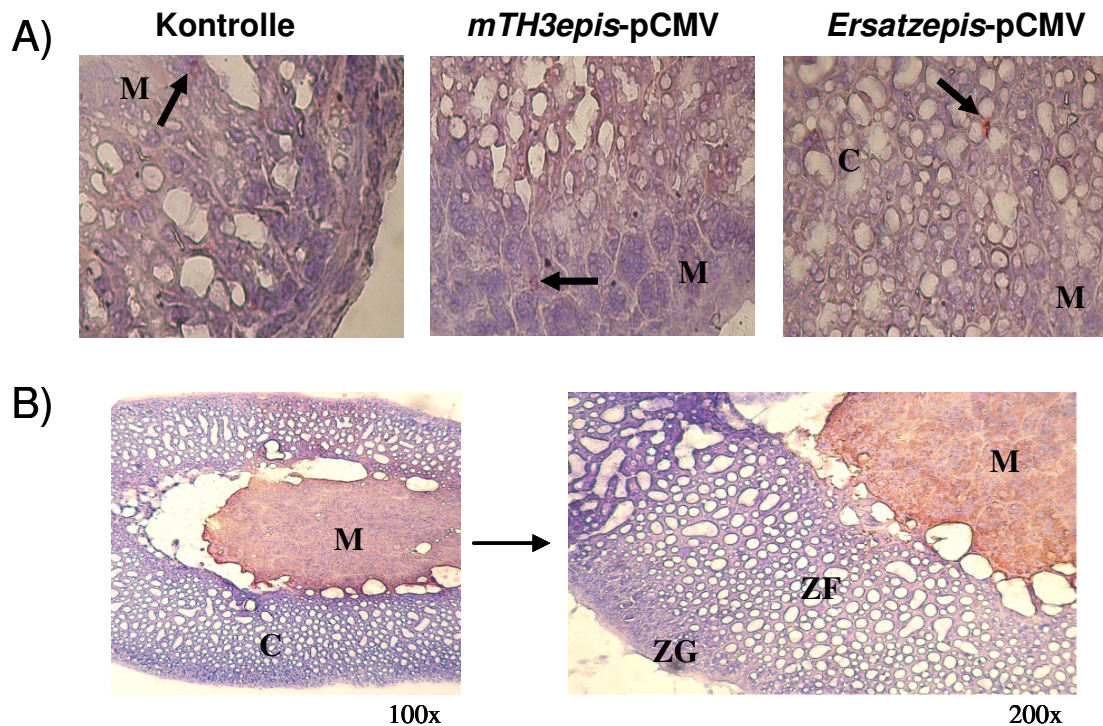


Abb. 31: Immunhistochemische Färbung gefrorener Nebennieren mit A) anti-CD8 und B) anti-TH-Antikörper

Im oberen Teil der Abbildung (A) sind beispielhaft mit anti-CD8-Antikörper gefärbte Nebennieren der Kontrollgruppe (links) und der beiden geimpften Gruppen (*mTH3epis*, mittig; und *Ersatzepis*, rechts) gezeigt, Vergrößerung 400x. Die schwarzen Pfeile zeigen CD8⁺-gefärbte Zellen. Eine mit anti-mTH-Antikörper gefärbte Nebenniere ist beispielhaft in 3.21 (B), mit 100facher (links) und 200facher Vergrößerung (rechts) gezeigt. Man sieht deutlich die rote Färbung der gesamten Medulla (M), der Bereich der Katecholaminproduktion in der Nebenniere. Außerdem gut zu erkennen sind der Cortex (C, Rinde) sowie die Zona fasciculata (ZF) und Zona glomerulosa (ZG).

3.10. Therapeutische Wirksamkeit der DNA-Vakzinierung mit *mTH3epis*-pCMV und *Ersatzepis*-pCMV

Nachdem in mehreren prophylaktischen Ansätzen die Fähigkeit der eingesetzten Vakzine, eine spezifische Anti-Tumorantwort *in vivo* auszulösen, gezeigt werden konnte, sollte die Wirksamkeit der DNA-Impfstoffe noch in einem therapeutisch angelegten Ansatz untersucht werden. Das Prinzip hierbei ist einfach: zuerst werden Mäusen Tumorzellen subkutan

injiziert. Erst wenn der Tumor meßbar ist, also etwa fünf Tage nach Injektion, beginnen die oralen Impfungen mit den Vakzin-tragenden Salmonellen. Aufgrund der kurzen Behandlungszeit vor der operativen Entfernung der Tumoren wurde hierbei der Zeitraum zwischen zwei Impfungen auf eine Woche verringert. Eine Woche nach der OP wurden die Impfungen wieder aufgenommen und bis zur Metastasenbildung mit einem Abstand von 10 Tagen weitergeführt. Das Behandlungsschema ist in Abb. 32 verdeutlicht.

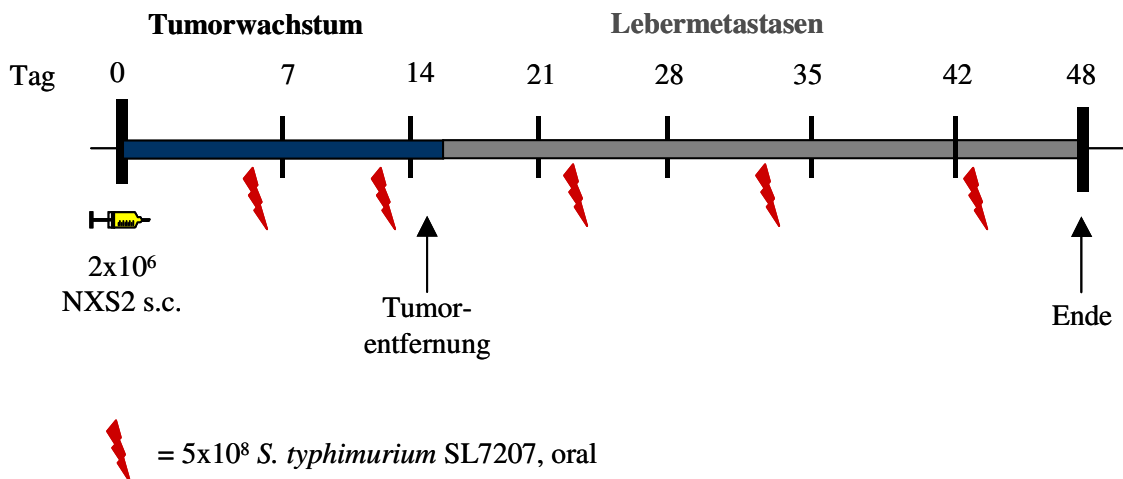


Abb. 32: Behandlungsschema bei einem therapeutischen *in vivo*-Ansatz

In der obigen Abbildung ist das Behandlungsschema eines therapeutischen Impfversuchs dargestellt. Im Gegensatz zu einem prophylaktischen Ansatz beginnen die Impfungen mit Plasmid-tragenden Salmonellen erst, wenn ein meßbarer Tumor entstanden ist. Auch nach der operativen Entfernung werden die Impfungen hierbei bis zum Versuchsende weitergeführt. Tag 0= Tumorzellinjektion, Tag 5= 1. Impfung, Tag 12= 2. Impfung, Tag 16= OP, Tag 23= 3. Impfung, Tag 33= 4. Impfung, Tag 43= 5. Impfung, Tag 48= Ende

In diesem therapeutischen Ansatz wurden die Mäuse in drei Gruppen von je 6 Mäuse eingeteilt: eine Kontrollgruppe, die während des gesamten Versuchs keine Impfungen bekam, eine zweite Gruppe, die mit *mTH3kepis*-pCMV geimpft wurde und eine dritte, die als Impfstoff die *Ersatzepis* im pCMV-Vektor erhielt.

Die Bestimmung der Tumorgrößen ab Tag 5 im therapeutischen *in vivo*-Ansatz ergab die in Abb. 33 gezeigten Tumorstadiumskurven. Die beiden DNA-Vakzine vermochten ein verzögertes Tumorstadium im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu induzieren. Die Reduktion fällt in diesem Ansatz jedoch weitaus geringer aus als in den zuvor durchgeführten prophylaktischen Versuchen. Gerade die letzte Messung an Tag 16 deutet ein im Folgenden ebenso steiles Wachstum an wie es in der Kontrollgruppe vorzufinden ist.

Anzumerken ist jedoch die kurzzeitige Stagnation des ansonsten stark voranschreitenden Tumorwachstums zwischen den Tagen 13 und 15, also zwei bis drei Tage nach der zweiten Impfung (Tag 15), welcher in der *Ersatzepis*-pCMV-Gruppe deutlicher ausfällt als in der *mTH3kepis*-pCMV-Gruppe. Diese Stagnation konnte in etwas geringerem Ausmaß in einem zweiten therapeutischen Impfversuch bestätigt werden, gleiches gilt für das verlangsamte Tumorwachstum in den geimpften Gruppen.

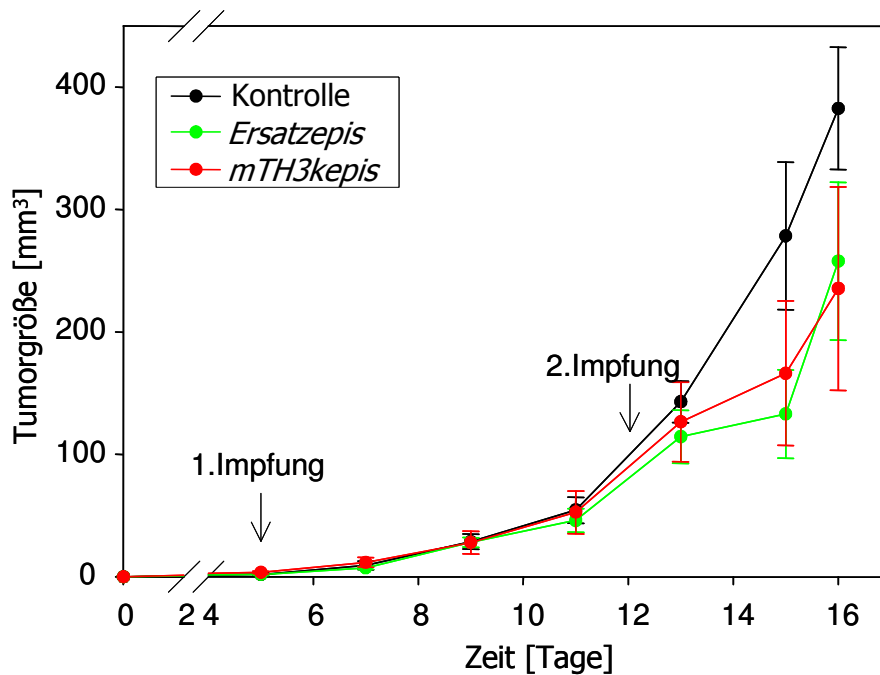


Abb. 33: Tumorwachstum in einem therapeutischen Vakzinierungsexperiment

In der obigen Abbildung ist das Tumorwachstum bei Mäusen in einem therapeutischen Ansatz gezeigt [n=6]. Zum Zeitpunkt 0 wurden den Mäusen aller drei Gruppen 2×10^6 NXS2-Zellen subkutan injiziert und die Tumorgößen ab Tag 5 erfaßt. An diesem Tag erfolgte auch die erste orale Impfung mit 5×10^8 Plasmidtragenden Salmonellen: *mTH3kepis*-pCMV (rot) und *Ersatzepis*-pCMV (grün), die Kontrollgruppe (schwarz) blieb unbehandelt. An Tag 12 erfolgte eine zweite Impfung mit ebenfalls 5×10^8 Salmonellen/Maus, auch hier blieb die Kontrollgruppe unbehandelt. An Tag 16 wurden die subkutan gewachsenen Tumoren operativ entfernt und ihr Gewicht bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorumfänge und zugehörige Standardabweichungen.

Der Einfluß der therapeutischen Impfungen auf das Tumorwachstum spiegelt sich auch in den Tumorgewichten wider, diese sind in Abb. 3.24 dargestellt. Hier liegen die mittleren Tumorgewichte in den zwei geimpften Gruppen zwar unterhalb des mittleren Tumorgewichts der Kontrollgruppe, diese Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant.

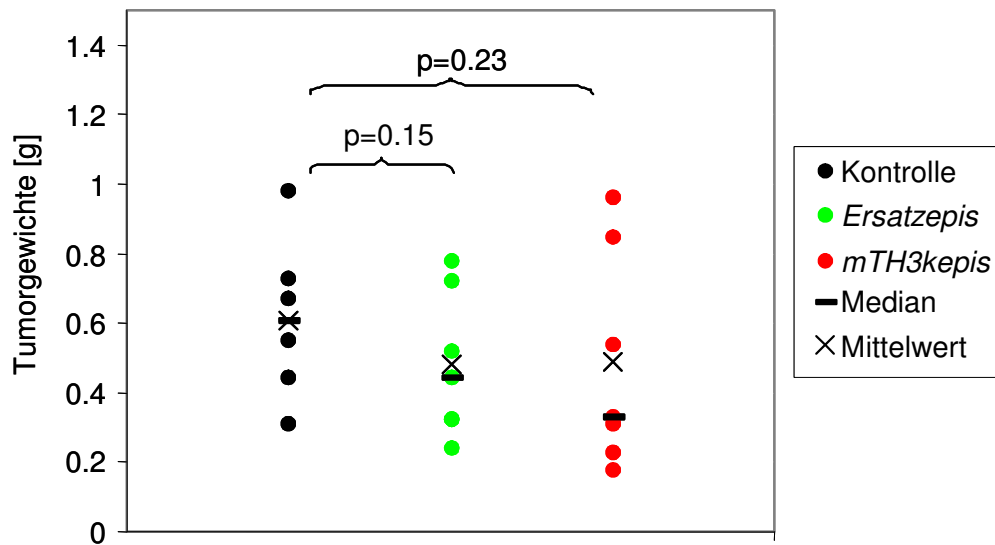


Abb. 34: Tumorgewichte in einem therapeutischen Vakzinierungsexperiment

In der obigen Abbildung sind die Tumorgewichte von Mäusen, die in einem therapeutischen Ansatz behandelt wurden, gezeigt. Nach operativer Entfernung der subkutanen Tumoren an Tag 16 wurden deren Gewichte bestimmt und die Mittelwerte und Mediane gebildet. Dargestellt sind: *mTH3kepis*-pCMV (rot), *Ersatzepis*-pCMV (grün) und die Tumoren der Kontrollgruppe (schwarz).

Insgesamt gesehen konnten keine statistisch signifikanten Tumorreduktionen in den beiden behandelten Mausgruppen festgestellt werden, was sicherlich auf das sehr aggressive und auch schnelle Tumorstadium im NXS2-Modell zurückzuführen ist. Der Zeitraum zwischen Tumordiagnose (Tag 5) und der operativen Entfernung (Tag 16) ist zu kurz, um mehr als zwei Impfungen durchzuführen. Aus diesem Grunde wurden die Impfungen auch nach der Tumorentfernung fortgeführt, um zu untersuchen, ob die Vakzine trotzdem in der Lage sind, eine Metastasierung der Lebern zu verhindern.

Nach operativer Entfernung der Tumoren wurden die Mäuse bis zur Entwicklung von Lebermetastasen ca. 4 Wochen beobachtet und dann getötet. Die Lebern wurden entnommen und die Gewichte sowie der Metastasierungsgrad bestimmt. In Abb. 3.25 und Tab. 3.4 sind die zugehörigen Ergebnisse dargestellt.

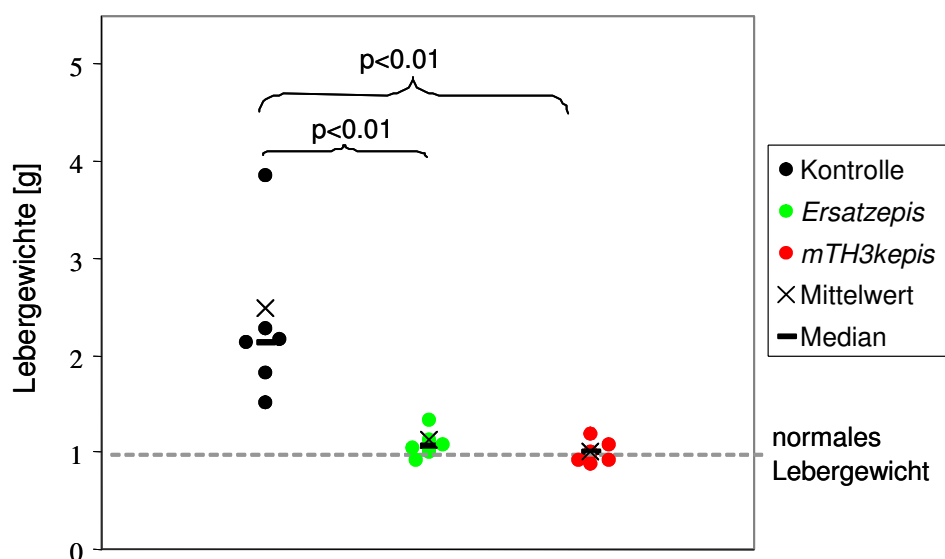


Abb. 35: Lebergewichte und Metastasierungsgrad *in vivo* nach therapeutischer Impfung mit *mTH3kepis*-pCMV und *Ersatzepis*-pCMV

Nach Beendigung des *in vivo*-Experiments wurden den Mäusen die Lebern entnommen und deren Gewichte (oben) sowie der Metastasierungsgrad bestimmt (Tab. 9). Der Befall der Leberoberfläche durch Neuroblastom-Metastasen lag dabei der Bestimmung des Metastasierungsgrads wie folgt zugrunde: 0% = 0, <20% = 1, 20-50% = 2, >50% = 3. Die Metastasierungsgrade der *Ersatzepis*-pCMV und der *mTH3kepis*-pCMV-Gruppe sind statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$) zu den anderen Gruppen („*“). Das durchschnittliche Lebergewicht einer ausgewachsenen A/J-Maus liegt zwischen 1 und 1.3 g.

Tab. 9: Metastasierungsgrad im therapeutischen Ansatz

Gruppe (n=6)	Anzahl Metastasen	Metastasierungsgrad
Kontrolle	alle >250	3, 3, 3, 3, 3, 3
<i>Ersatzepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 2, 3	0, 0, 0, 0, 1, 1 *
<i>mTH3kepis</i> -pCMV-F3Ub	0, 0, 0, 0, 1, 2	0, 0, 0, 0, 1, 1 *

Im Gegensatz zum Primärtumorstadium konnten beide DNA-Vakzine im therapeutischen Ansatz effektiv eine Metastasierung der Lebern verhindern. In beiden geimpften Gruppen waren 4 von 6 Lebern metastasenfrei, bei jeweils zwei Lebern aus diesen Gruppen konnte ein Metastasierungsgrad von unter 20% festgestellt werden. Dagegen waren die Lebern der Kontrollmäuse vollständig von Metastasen durchsetzt.

4. Diskussion

Das Neuroblastom ist der häufigste solide Tumor im Kleinkindesalter. Sein aggressives Wachstum in Kombination mit fehlenden Möglichkeiten zur Früherkennung und wenig erfolgreichen Therapiemöglichkeiten für die ausgedehnten Tumorstadien 3 und 4 sind der Grund für die schlechte Prognose der an Neuroblastom erkrankten Kinder. Daß die derzeit verwendeten Therapieansätze die Überlebensrate in den letzten zwei Jahrzehnten nicht wesentlich zu steigern vermochten, verdeutlicht die Dringlichkeit der Entwicklung neuer, innovativer Behandlungsmethoden, die die heute eingesetzten Mittel in ihrer Wirksamkeit entweder verstärken können oder sogar selber einen Anti-Tumoreffekt induzieren.

Der Weg hin zu einer neuartigen Behandlung des Neuroblastoms mit tumorimmunologischem Ansatz wurde mit der vorliegenden Arbeit eingeschlagen. Erstmals wurde ein Minigen-DNA-Impfstoff eingesetzt, der auf basierend auf der Tyrosinhydroxylase die Induktion einer aktiven, gegen den Tumor gerichteten Immunantwort im syngenischen Mausmodell vermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß der oral applizierte Impfstoff *in vivo* eine effektive Reduktion des Primärtumorstadiums zur Folge hat sowie die Metastasierung der Lebern der behandelten Mäuse weitestgehend verhindert. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die zu Grunde liegende Immunantwort durch spezifische zytotoxische T-Zellen vermittelt wird.

Im folgenden sollen nun einige wesentliche Aspekte, die für die Wirksamkeit eines DNA-Vakzins im allgemeinen und eines Minigen-Vakzins im speziellen ausschlaggebend sind, besprochen werden. Dabei wird auf den Effekt eines optimierten Vakzin-Designs eingegangen, dessen Ziel die Induktion einer CD8⁺T-Zell-vermittelten Immunantwort sein soll. Die Auswahl der Epitope eines tumorassoziierten Antigens (TAA) aufgrund ihrer MHC-Klasse-I-Bindungsaffinitäten ist dabei ebenso wichtig wie die Modifizierung des Vektordesigns, um eine optimale Prozessierung durch das Proteasom zu induzieren. Außerdem werden die Ergebnisse zur Induktion einer spezifischen Immunantwort durch das TH-DNA-Minigen-Vakzin im *in vivo*-Modell diskutiert und auf die wichtige Rolle der attenuierten Bakterien als Vakzin-Vehikel eingegangen, die aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit als *danger signal* für das murine oder humane Immunsystem fungieren und demnach eine nicht zu unterschätzende Adjuvanzfunktion haben.

Abschließend sollen verschiedene Möglichkeiten des klinischen Einsatzes eines auf der TH basierenden DNA-Vakzins besprochen werden, wobei sich die Frage nach dem Einsatzzeitpunkt und der Applikationsform als essentiell darstellt.

4.1. Das Vakzin-Design

4.1.1. Das Neuroblastom - ein MHC-Klasse-I-defizienter Tumor?

Therapiestrategien, die eine CTL-vermittelte Immunantwort induzieren sollen, werden oft als wenig effektiv angesehen, wenn es um die Behandlung des schwach immunogenen Neuroblastoms geht. Dies liegt darin begründet, daß sich in der Wissenschaftswelt die Meinung hält, daß das Neuroblastom *per se* MHC-Klasse-I-defizient und deshalb die Induktion neuroblastomspezifischer CTLs nicht erfolgversprechend sei. Diese Erkenntnisse beruhen zumeist auf immunhistologischen und FACS-Analysen, die jedoch nur einen momentanen Zustand der Oberflächenstruktur einer Zelle widerspiegeln und keine Aussage über die Fähigkeit zur Expression bestimmter Gene ermöglichen. Tatsächlich ist in vielen Neuroblastomen die MHC-Klasse-I-Expression herunterreguliert, aber nicht vollständig abgeschaltet, was möglicherweise im Zusammenhang mit der gleichzeitigen Überexpression des N-myc-Onkogens steht. Dieses ist für die verringerte Expression der p50-Untereinheit von NF- κ B verantwortlich, einem Transkriptionsfaktor des *enhancer A*-Elements des MHC-Klasse-I-Gen-Promotors ('t Veer *et al.* 1993). Die MHC-Klasse-I-Expression kann u.a. durch IFN- γ heraufreguliert werden, was für Neuroblastomzellen gezeigt werden konnte (Drew *et al.* 1993).

Allerdings konnten verschiedene Gruppen zeigen, daß eine Lyse durch hochaffine zytotoxische T-Zellen bereits von <10-100 Liganden pro Zelle induziert wird (Christinck *et al.* 1991), (Sykulev *et al.* 1996). Spierings *et al.* bewiesen sogar, daß die unter physiologischen Bedingungen exprimierte, limitierte Anzahl an MHC-Klasse-I-Molekülen auf einer murinen Neuroblastomzelllinie (C1300) ausreichte, um eine Erkennung durch und Aktivierung von CTLs zu induzieren (Spierings *et al.* 2000). Dies beweist, daß nicht unbedingt die Anzahl an MHC-Klasse-I-Molekülen, die auf einer Zielzelle exprimiert sind, ausschlaggebend ist für die Effektivität einer Immunantwort, sondern vielmehr die Affinität der jeweiligen CD8⁺-T-Zell-Liganden zu den zugehörigen spezifischen T-Zellen.

4.1.2. Optimierung der MHC-Klasse-I-Liganden

Das Auffinden eines in Frage kommenden TAA als Basis für ein DNA-Vakzin ist nur ein erster Schritt in der immuntherapeutischen Behandlung von malignen Erkrankungen.

Im folgenden ist jedoch die Auswahl der „besten“ MHC-Klasse-I-bindenden Peptide, für die das DNA-Vakzin kodieren soll, ein ebenso wichtiger Schritt, wenn man mit der Impfstrategie eine zytotoxische T-Zell-Antwort hervorrufen will. Hierfür ist die Kenntnis der MHC-Klasse-I-Allele, die von einer Spezies (beispielsweise von Mäusen) oder einem Individuum (Mensch) exprimiert werden, ausschlaggebend. Denn ein Peptid, das für ein MHC-Klasse-I-Allel eine hohe Bindungsaffinität aufweist, wird an andere Alleltypen überhaupt nicht binden. Dies beruht auf der Tatsache, daß je nach MHC-Klasse-I-Molekül die Bindungstaschen und somit die passenden sog. Ankerpositionen der Peptide variieren. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten *in vivo*-Systems, der A/J-Maus, handelt es sich um die MHC-Klasse-I-Allele H2-D^d und H2-K^k, wovon letzteres für die Konstruktion der DNA-Vakzine aus der murinen TH-Sequenz ausgewählt wurde. Die Ankerpositionen der an MHC-I-bindenden Peptide sind beim H2-K^k-Allel die Peptidpositionen 2 (P2) und 8 (P8) (bzw. 9 (P9), wenn es sich um ein Nonapeptid handelt), wobei hier immer vom N- zum C-Terminus der Peptide gezählt wird. In der Position P2 steht dabei idealerweise ein Glutamat-Rest (E), während für P8 sowohl Valin (V) als auch Isoleucin (I) in Frage kommen, wobei die AS Isoleucin an P9 ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität an H2-K^k vermittelt. Die anderen Peptidpositionen sind mehr oder weniger variabel: so ist an P3 am häufigsten ein Methionin (M)-, Valin (V)-, Lysin (K)- oder Leucin (L)-Rest zu finden, an P7 dagegen Asparagin (N) und Methionin (Burrows *et al.* 1996), (Norda *et al.* 1993).

Im Falle der in dieser Arbeit durchgeführten Vakzinierungsstudien bewies das Design der Minigen-Peptide Effektivität in Bezug auf die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort. Sowohl die *Ersatz*-Epitope als auch das von der mTH-Sequenz abgeleitete Minigen-Vakzin *mTH3k*-pCMV weisen in ihrer AS-Sequenz in den jeweiligen Ankerpositionen P2 und P8 (bzw. P9 für TEALPVKLI aus der Reihe der *Ersatz*-Epitope) die idealen Anker-Aminosäuren für H2-K^k auf: Glu (P2) und Ile bzw. Val (P8, P9). Im Gegensatz dazu wurde das Vakzin *mTHlowest*-pCMV so konzipiert, daß die Ankerpositionen mit Aminosäuren belegt sind, die nicht idealerweise an das H2-K^k-Molekül binden: an P2 befinden sich die AS His, Arg und Phe, während an P8 die AS Ala, Asp und Leu stehen (s. Tab. 4.1). Die Ergebnisse der Impfversuche mit dem *mTHlowest*-Minigen zeigen, daß das Vakzin-Design, also die AS-Abfolge, für die die DNA-Vakzine kodieren, ausschlaggebend

ist für den Erfolg einer solchen Impfung. Hinzugefügt sei hier noch, daß keines der verwendeten Vakzine für Peptide kodiert, die als affine *binder* für das zweite MHC-Klasse-I-Allel der A/J-Maus (H2-D^d) fungieren könnten: hier finden sich mit den Positionen P2, P3 und P9 gleich drei Ankerpositionen für Peptide an H2-D^d, die im übrigen zumeist eine Länge zwischen 9 und 10 AS aufweisen (*syfpeithi*). Anzumerken ist außerdem, daß der im Minigen-Design enthaltene HA-Tag weder eine nennenswerte Bindungsaffinität an H2-K^k noch an H2-D^d aufweist (s. Abb. 36).

Minigenpeptidsequenzen N-term → C-term P1 → P8/P9									Minigen-Vakzin
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	<i>Ersatzepis- pCMV-F3Ub</i>
T	E	A	L	P	V	K	L	I	
N	E	Y	I	M	S	L	I	-	
F	E	M	V	S	T	L	I	-	
F	E	T	F	E	A	K	I	-	<i>mTH3kepis- pCMV-F3Ub</i>
E	E	R	D	G	N	A	V	-	
V	E	I	T	K	E	E	I	-	
H	H	L	E	T	R	P	A	-	<i>mTHlowest- pCMV-F3Ub</i>
P	R	K	V	S	E	L	D	-	
Q	F	S	Q	D	I	G	L	-	
Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	HA-Tag

Abb. 36: Vakzin-AS-Sequenzen und H2-K^k-Ankerpositionen

In Abb. 36 sind die AS-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Vakzine mitsamt der für das MHC-Klasse-I-Allel H2-K^k spezifischen Ankerpositionen P2 und P8 bzw. P9 (grün) dargestellt.

Mit dem Wachsen der Datenbanken wie *syfpeithi*, RANKPEP oder auch BIMAS erweitern sich die Kenntnisse über die zu jedem MHC-Allel spezifischen Peptid-Liganden, ihre Bindungsaffinitäten und die jeweils zugehörigen Ankerpositionen im MHC-Klasse-I-Molekül. Dieses Wissen kann zur Optimierung „schwacher“ MHC-Klasse-I-bindender Peptide genutzt werden, wie sie u.a. manche tumorassoziierte Antigene aufweisen. So konnten Rosenberg *et al.* 1998 erstmals erfolgreich eine Peptid-Vakzinierung bei Melanom-Patienten durchführen, indem sie bestimmte AS-Reste, u.a. an den Ankerpositionen, in

immundominanten Peptiden aus dem Melanom-assoziierten Antigen gp100 austauschten und sich infolgedessen die Anzahl an antigenspezifischen CTLs signifikant erhöhte (Rosenberg *et al.* 1998). In der Natur wird die umgekehrte „Technik“ von Viren verwendet: durch Mutationen an bestimmten Peptid-Positionen der Virusproteine wird die Bindungsaffinität von Peptiden an MHC-Klasse-I stark verringert und somit einer Aktivierung von virusspezifischen CD8⁺-T-Zellen entgegengewirkt (*immune escape*) (Tissot *et al.* 2000), (Pircher *et al.* 1990).

4.1.3. Die Rolle vom Ubiquitin-Ala₇₆

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, DNA-Vakzine zur gentherapeutischen Behandlung des Neuroblastoms herzustellen, die *in vivo* eine effektive, CTL-vermittelte Immunantwort auslösen. Ausschlaggebend hierfür ist der proteasomale Abbau der durch die DNA-Vakzine kodierten Minigen-Peptide, die dann im Anschluß, gebunden in MHC-Klasse-I-Komplexen, spezifischen zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden können.

In den für diese Arbeit durchgeführten Expressionsstudien mit COS7-Zellen konnte eine Polyubiquitinierung der Minigenpeptide gezeigt werden. Über einen Zeitraum von bis zu 98 Stunden nach Transfektionsstart nahm die Konzentration an polyubiquitinierten Minigenpeptiden im Zellysate ab, während die nicht-ubiquitinierten Formen stabil blieben. Es könnte sein, daß eine Poly- und darauf folgend eine durch nicht Proteasom-assoziierte DUBs (*deubiquitinating enzymes*) vermittelte Deubiquitinierung stattfindet, ohne daß das Proteasom involviert ist. Für diese Theorie spricht die Tatsache, daß keine verkürzten Formen der Minigenpeptide zu detektieren waren, sondern nur die 4.9 bzw. 4.6 kDa großen Fragmente der vollständigen *mTH3kepis*- bzw. *Ersatzepis*-Peptide. Andererseits ist aber davon auszugehen, daß COS7-Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen keine Immunoproteasomen bilden, deren veränderte Schnittstellenpräferenz die Bildung besonders immundominanter Epitope fördert (Sijts *et al.* 2000), und die Generierung der einzelnen Minigenepitope gewährleisten sollte. Auch die Beteiligung des Proteasomenaktivators PA28, der eine verstärkte Präsentation besonders immundominanter Epitope vermittelt, ist unter physiologischen Normalbedingungen eher auszuschließen (Sun *et al.* 2002), (Soza *et al.* 1997). Dies wäre ein Grund für das Ausbleiben verkürzter Minigenpeptide in den *in vitro*-Expressionsstudien.

Für eine Beteiligung des Proteasoms an der Prozessierung der Minigenpeptide sprechen dagegen die Resultate der Expressionsstudien unter Einfluß des Proteasomeninhibitors

Lactacystin. Lactacystin, oder vielmehr dessen Hydrolyseprodukt clasto-Lactacystin β -Lacton, hemmt durch eine kovalente Bindung an die $\beta 5$ -UE die proteolytische Aktivität des 20S-CP (Groll *et al.* 1997), (Fenteany *et al.* 1995). Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen die Expression polyubiquitinerter Minigenpeptide unter Einfluß von Lactacystin. Eine Bildung mono- oder nicht-ubiquitinerter Minigenderivate konnte nicht nachgewiesen werden. Es kann davon ausgegangen werden, daß Lactacystin nicht nur den 20S-CP, sondern auch andere Funktionen des 26S-Proteasoms, wie die Deubiquitinierung durch den 19S-Regulator, hemmt und somit die Gesamtfunktion der Abbaumaschinerie inhibiert (Craiu *et al.* 1997). Diese Theorie wird durch die Tatsache untermauert, daß es *in vivo* nach einer Vakzinierung zur Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen kommt, was eindeutig für den proteasomalen Abbau der applizierten Vakzine in Mäusen spricht.

Daß die Kopplung an die proteasomale Degradation durch eine Ubiquitinierung so wichtig ist, liegt in der Tatsache begründet, daß die Ubiquitinierung unmittelbaren Einfluß auf die MHC-Klasse-I-Präsentation von AG-Peptiden hat. So konnten beispielsweise Grant *et al.* eindeutig zeigen, daß die Hydrolyserate von AG den limitierenden Schritt für ihre Präsentation in MHC-Klasse-I darstellt (Grant *et al.* 1995). Unter normalen Bedingungen ist der N-Terminus eines zellulären Proteins ausschlaggebend für dessen Halbwertszeit. Die N-terminalen AS beeinflussen die Geschwindigkeit der Ubiquitinierung und somit natürlich auch den Abbau - diese Erkenntnis ist seit ihrer Feststellung 1986 als *N-end-rule* bekannt (Bachmair *et al.* 1986). Demnach vermitteln bestimmte N-terminale AS (z.B. Arg, Lys, Phe, Leu oder Asp) eine schnellere Ubiquitinierung als andere, wie z.B. Valin, Ser, Ala, Thr, Gly oder Met. Besonders für letztere leuchtet dies ein - beginnen doch die meisten Proteine mit Methionin. Auch acetylierte N-Termini interferieren mit der Erkennung durch die an der Ubiquitinierung beteiligten Proteine (E1-E3), können diese aber nicht vollständig verhindern (Mayer *et al.* 1989).

Wenn nun Proteine, bestimmte Modell-AG oder, wie in der vorliegenden Arbeit, die von den DNA-Vakzinen kodierte Minigen-Peptide nicht unbedingt nach der *N-end-rule* destabilisierende N-Termini aufweisen (wie z.B. Thr im Minigen *Ersatzepis*-pCMV) und somit nicht „von selbst“ einer Polyubiquitinierung zugeführt werden, soll die durch das Vektor-Design vermittelte Ubiquitinierung genau dies provozieren. Dabei stellt sich die Frage, warum der Vektor pCMV-F3Ub so konzipiert wurde, daß er nicht für das WT-Ub-Gen sondern für ein am C-Terminus mutiertes Ub-Gen kodiert.

Um diese Frage zu beantworten, bedarf es einer weitergehenden Erklärung: WT-Ub weist eine kompakte, globuläre Domäne mit einem Carboxy-terminalen „Schwanz“ auf bestehend aus den letzten vier AS Leu₇₃-Arg₇₄-Gly₇₅-Gly₇₆-COOH (Vijay-Kumar *et al.* 1987). Über die C-terminale Carboxygruppe kommt es zur kovalenten Bindung an die ε-NH₂-Gruppe eines Lysin-Rests im Zielprotein (Hershko *et al.* 1980). In eukaryotischen Zellen kodiert das Genom für viele aufeinander folgende Wiederholungen eines monomeren Ub-Gens: Das primäre Translationsprodukt ist also Polyubiquitin (Finch *et al.* 1990). Mittlerweile steht fest, daß eine bestimmte Gruppe von Proteasen (DUBs) für die Erkennung dieser Ub-Abfolge verantwortlich ist. Es gibt fünf Untergruppen, in die die DUBs unterteilt werden können; zu ihnen zählen u.a. die UBPs (*ubiquitin-specific processing proteases*) und die UCHs (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*) (Review bei (Amerik & Hochstrasser 2004), von denen einige für die vom 19S-Regulator vermittelte Deubiquitinierung von Proteasomsubstraten verantwortlich sind.

DUBs haben demnach u.a. die Aufgabe, die entstehenden Polyubiquitinketten in Ub-Monomere zu zerlegen, um sie so anderen Reaktionen zugänglich zu machen. Die Spaltung erfolgt nach jedem Gly₇₆ (Wilkinson 1997). Es wird dabei ein ko-translational erfolgreicher Prozess vermutet, da zu diesem Zeitpunkt die wachsende, noch inkomplette Polypeptidkette sterisch eher für ein Enzym zugänglich ist als das gereifte, fertig gefaltete Protein (Baker *et al.* 1992), (Wing 2003).

Übertragen auf das Vektor-Design würde dies aber das genaue Gegenteil von dem bewirken, was mit der Bildung eines Ub-Fusionsproteins erreicht werden soll: die Minigen-Peptid-Ub-Bindung würde nach der Translation vermehrt am Ub-Gly₇₆ gespalten, bevor es zur Ausbildung einer Polyubiquitin-Kette kommen und somit die Prozessierung durch das Proteasom erfolgen kann. Die Mutation von Gly₇₆ zu Ala₇₆ bewirkt eine Erhöhung der Stabilität der Ub-Fusionsproteinbindung vor proteolytischen Angriffen, was Ecker *et al.* in ihren Versuchen zeigen konnten (Ecker *et al.* 1989). Durch die erhöhte Stabilität der Bindung des Ub an die Minigen-Peptide sollen somit die nötigen Voraussetzungen für die Ausbildung einer Polyubiquitinkette gegeben werden, was letztlich den proteasomalen Abbau zur Folge hat.

Die Auswirkungen einer WT-Ub-Bindung an ein Peptid (also im pCMV-F3Ub-WT) machen sich im Falle der getesteten DNA-Vakzine in einem völligen Ausbleiben einer Anti-Neuroblastom-Immunantwort *in vivo* eindeutig bemerkbar; sowohl was die Inhibition des primären Tumorwachstums als auch der Lebermetastasierung angeht (Abschnitt 3.6.3.). Die

gleichen DNA-Vakzine im mutierten Vektor (pCMV-F3Ub) dagegen vermitteln ein reduziertes Wachstum des Primärtumors und eine Verhinderung der Lebermetastasierung und lösen, wie in zytolytischen Assays mit Cr51 eindeutig gezeigt werden konnte, eine spezifische CD8⁺-T-Zell-vermittelte Immunantwort aus.

4.2. Die induzierte Immunantwort ist CTL-vermittelt und spezifisch

4.2.1. Induktion spezifischer CTLs

Eine naive CD8⁺T-Zelle wird aktiviert, nachdem sie ein für sie spezifisches Epitop erkannt hat, welches ihr in einem MHC-Klasse-I-Komplex von professionellen APCs präsentiert wird. Erst dann wird sie zur vollständigen Ausdifferenzierung und klonalen Expansion angeregt und erlangt am Ende dieses Prozesses die Fähigkeit, Zellen zu lysieren, die das spezifische Epitop auf ihrer Oberfläche in MHC-Klasse-I-Komplexen exprimieren. Diese Fähigkeit zur spezifischen Lyse von Zielzellen birgt auch in der Antitumor-Immuntherapie ein großes, bisher nicht genutztes therapeutisches Potential.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach Impfung mit einem auf mTH-T-Zell-Epitopen basierenden DNA-Vakzin eine gegen das Neuroblastom gerichtete Immunantwort induziert werden (Abschnitt 3.7). Die Art dieser Immunantwort wurde mittels Zytotoxizitätstest unter Verwendung verschiedener Zielzellen (NXS2, SCK) analysiert (Abschnitt 3.8). Beide Zelllinien stammen aus der A/J-Maus, sind also syngen im verwendeten Mausmodell, und exprimieren MHC-Klasse-I. Sie unterscheiden sich allerdings in der Fähigkeit zur Expression der Tyrosinhydroxylase: Während NXS2-Zellen dies aufgrund ihrer Abstammung von neuronalen Zellen tun, sind SCK-Zellen als Mammarkarzinom-Zellen TH-defizient, was in dieser Arbeit auch auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR gezeigt werden konnte.

Aus Milzen von mit *mTH3kepis*-pCMV und *Ersatzepis*-pCMV geimpften Mäusen wurden Lymphozyten isoliert und als Effektorzellen in einem Cr51-*release-assay* eingesetzt. Um eine durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität auszuschließen, wurde die NK-Zell-sensitive Zelllinie YAC-1 als Zielzelle eingesetzt. Es fand jedoch keine Lyse der YAC-1-Zellen statt (Abschnitt 3.7.3), was den Schluß zuläßt, daß die *in vivo*-vermittelte Anti-Neuroblastom-Immunantwort nicht von NK-Zellen abhängt.

Die Lyse der anschließend als Zielzellen eingesetzten NXS2 läßt sich somit auf die zytotoxische Aktivität von CD8⁺T-Zellen zurückführen. Daß diese Lyse nur von Splenozyten aus geimpften Mäusen ausging, nicht aber von denen der ungeimpften Kontrollgruppe, weist

auf die Spezifität der induzierten Immunantwort hin. Diese konnte im Anschluß eindeutig gezeigt werden, als mit mTH3-Peptiden gepulste SCK-Zellen von Splenozyten aus der *mTH3kepis*-Gruppe, nicht aber aus der *Ersatzepis*-Gruppe, lysiert wurden.

Die gesteigerte IFN- γ -Produktion in Kokulturen von aus geimpften Mäusen isolierten Splenozyten und bestrahlten NXS2-Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe unterstützt diese Ergebnisse (Abschnitt 3.7.2).

Einen zusätzlichen Beweis für die verstärkte Aktivität von CTLs gegenüber NXS2-Zellen in geimpften Mäusen erbrachten die immunhistochemischen Färbungen von Primärtumor-Material. Hier zeigte sich eine Zunahme an tumorinfiltrierenden CD8⁺T-Zellen im Vergleich zu Tumoren aus der Kontrollgruppe (Abschnitt 3.7.1). Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit dem reduzierten subkutanen Tumorwachstum sowohl in den verschiedenen prophylaktischen, als auch im therapeutischen *in vivo*-Experiment.

4.2.2. Induktion eines immunologischen Gedächtnisses?

Wie der vorgestellte therapeutisch angelegte *in vivo*-Versuch zeigte, ist es zumindest im Mausmodell schwierig, einen bereits etablierten Tumor signifikant am weiteren Wachstum zu hindern. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die sehr aggressive Natur des NXS2-Modells zurückzuführen, was sich in der enormen Wachstumsgeschwindigkeit der subkutanen Tumoren widerspiegelt: bereits nach rund 14 Tagen müssen die Tumoren, die zu diesem Zeitpunkt bereits hochgradig nekrotisiertes Tumorgewebe enthalten, operativ entfernt werden. Der Zeitraum von der ersten Impfung an Tag 5 bis zur Tumorexzision ist wahrscheinlich zu kurz, als daß sich eine effektive gegen den Tumor gerichtete Immunantwort induzieren ließe. Interessanterweise scheinen die durch die Impfungen induzierten zytotoxischen T-Zellen jedoch ein kurzzeitig verlangsamtes Wachstum der Primärtumoren zu vermitteln, was sich durch eine zeitweise Stagnation der Tumorwachstumskurven ca. drei Tage nach der zweiten Impfung äußert (in Abb. 3.23, Tag 15). Die bereits sehr weit fortgeschrittene Größe des Primärtumors vermögen sie zu diesem Zeitpunkt nicht weiter zu beeinflussen, hingegen aber sehr wohl die Ausbreitung des Metastasierungsprozesses (Abb. 3.25).

Die Auswertung der Lebermetastasierungsgrade zeigte eindeutig, daß die verwendete Impfstrategie, unter Nutzung des mutierten Vektors pCMV-F3Ub, eine effektive nachhaltige Antitumor-Immunantwort induziert. Insbesondere in den prophylaktischen

Vakzinierungsstudien, bei denen nur drei Impfungen insgesamt und diese alle vor der Tumorzellapplikation erfolgten, war der Schutzeffekt am meisten ausgeprägt. Hier wurde durch die zeitlich weit vor der Metastasierung liegenden Impfungen (ca. 5-6 Wochen von der letzten Impfung bis zur Ausbildung von Metastasen in der Kontrollgruppe) eine ausreichende Antitumor-Immunantwort induziert was auch durch die immunhistochemischen Analysen belegt wird (Abb. 3.15, 3.16). Dies könnte ein Indiz sein für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, vermittelt durch Gedächtnis-CD8-T-Zellen (*memory CD8 T cells*). Um dies näher zu untersuchen, müßten Mäuse aus geimpften Gruppen in einem Langzeitexperiment (über mehrere Monate) nach Primärtumorexzision weiter beobachtet werden, wobei auch erneute Impfungen („Auffrischungen“) und eine *rechallenge* mit Tumorzellen denkbar wären. Die Charakterisierung von in lymphoidalen Organen wie der Milz oder auch im Knochenmark der Mäuse enthaltenen CD8⁺T-Zellen könnte sich hier anschließen. Dabei ließen sich Epitop-spezifische CD8⁺T-Zellen mittels MHC-Klasse-I-Pentameren durchflußzytometrisch nachweisen. Da sich Gedächtnis-CD8-T-Zellen außerdem durch eine erhöhte Expression von CD44 und des IL-2R β auszeichnen (Zhang *et al.* 1998) (Ku *et al.* 2000), sollte eine Abgrenzung von anderen CD8-T-Zellen im T-Zell-Pool möglich sein. Eine Reaktivierung der Immunantwort sollte sich in diesem Fall ebenfalls anhand äußerer Parameter wie Tumorwachstum und Lebermetastasierung erkennen lassen.

4.2.3. Experimentell isolierte vs. vorhergesagte MHC-Klasse-I-Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben den vorhergesagten CD8⁺T-Zell-Epitopen der mTH (*mTH3kepis*-pCMV-F3Ub) auch ein DNA-Vakzin hergestellt, welches für Peptide kodiert, die auf den im *in vivo*-Versuch eingesetzten Neuroblastomzellen NXS2 in MHC-Klasse-I-Komplexen nachgewiesen werden konnten (*Ersatzkepis*-pCMV-F3Ub). Diese Peptide stellen also offensichtlich natürliche CD8⁺T-Zell-Epitope dar, konnten aber in keinster Weise mit vom Neuroblastom spezifisch exprimierten, tumorassoziierten Antigenen in Verbindung gebracht werden. Der Grund für den Einsatz dieses Vakzins war, eine Positivkontrolle für die Vakzinierungsstudien zu erhalten. Tatsächlich ergab sich eine gleichwertige Effektivität des „natürlichen“ und des „vorhergesagten“ Vakzins. An dieser Stelle soll deshalb nicht unerwähnt bleiben, daß es durchaus möglich wäre, einen solchen „natürlichen“ Impfstoff therapeutisch einzusetzen. Die damit verbundenen Nachteile liegen jedoch auf der Hand: Es würde sich hierbei um einen Impfstoff handeln, der auf einen Patienten individuell

abgestimmt, also patientenspezifisch wäre. Die der Konstruktion eines solchen Vakzins vorangehenden Arbeiten würde demnach eine genaue Identifikation der in den jeweiligen MHC-Klasse-I-Molekülen des diagnostizierten Tumors exprimierten Peptid-Liganden beinhalten, beispielsweise über eine Immunpräzipitation der MHC-Klasse-I-Moleküle aus frischem Tumormaterial und einer darauffolgenden Analyse der gebundenen Liganden. Dieser Prozeß müßte im Behandlungsschema berücksichtigt werden und wäre sowohl vom zeitlichen als auch finanziellen Aufwand natürlich der Herstellung eines für ein TAA kodierenden DNA-Minigen-Vakzins, welches bei allen Patienten eines definierten HLA-Typs anwendbar wäre, unterlegen. Wie sich die beiden Strategien letztendlich im Menschen unterscheiden bzw. ob es wie im Mausversuch keinen nennenswerten Effektivitätsunterschied gibt, läßt beim gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse keine eindeutige Aussage zu. Desweiteren beweisen die für diese Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimente die Effektivität der MHC-Klasse-I-Ligandenprogramme wie *syfpeithi*, wenn es darum geht, hoch affine Peptide aus der Gesamtsequenz eines TAA auszuwählen. Die erhaltenen Ergebnisse mit den aus der TH stammenden vorhergesagten, hoch affinen MHC-Klasse-I-Liganden lassen vermuten, daß diese Methode auch auf andere Tumorentitäten übertragbar sein könnte. Dies birgt ein zusätzliches Potential, wenn es darum geht, adjuvante immuntherapeutische Strategien zur Behandlung anderer schwach immunogener Krebsarten zu entwickeln.

4.3. Bakterielle DNA-Vehikel für den Einsatz beim Menschen

Der Einsatz attenuierter Bakterien, die lediglich als Vehikel für DNA-Vakzine dienen, ist zur Zeit Gegenstand mehrerer Studien; bis zu diesem Zeitpunkt wurde jedoch noch kein bakterieller *carrier* für die Anwendung am Menschen freigegeben (Holmgren & Czerkinsky 2005). Die fakultativ intrazellulären pathogenen Bakterien aus der Reihe der *Salmonella enterica*, zu denen auch die Serovare Typhi und Typhimurium zählen, gelangen normalerweise auf dem mukosalen Weg, meist durch Nahrungsaufnahme, in den menschlichen Magen-Darm-Trakt, wo sie eine Gastroenteritis hervorrufen. Sie infiltrieren spezifisch induktive Stellen in ihren Wirtsorganismen, wie mukosale Oberflächen und dort ansässige APCs, was auf ihren Gewebstropismus zurückzuführen ist (Mollenkopf *et al.* 2001). Gleiches gilt für die Bakterienstämme *Shigella flexneri* und *Listeria monocytogenes*,

die jedoch, anders als die *Salmonellae*, dem Phagosomen entkommen und sich im Zytosol der Wirtszelle vermehren.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über den derzeitigen Stand des Einsatzes attenuierter Bakterien im Menschen gegeben werden, der sich mit ihrer Funktion als „Vehikel“ für Antigene beschäftigt und mit den derzeit für am vielversprechendsten gehaltenen Attenuierungen.

4.3.1. *Shigella* spp.

Aufgrund ihrer starken Infektiosität sind Shigellen nur langsam ins Visier der Forscher gelangt, so daß es noch keine Untersuchungen zur ihrer Effektivität als Antigen-Vehikel im menschlichen System gibt. Hier beschränkten sich die Experimente bisher auf die Herstellung eines Shigellose-Vakzins. Virulente Shigellen befallen nach oraler Aufnahme die Epithelzellen im Darmbereich des Menschen, von wo aus sie sich von Zelle zu Zelle ausbreiten und in diesem Zuge eine starke CD8⁺T-Zellantwort in ihrem Wirt hervorrufen. Eine systematische Herangehensweise zur Findung der am besten geeigneten Attenuierungen wird anhand von *Shigella flexneri* deutlich: nach und nach wurden unterschiedliche Genmutationen (auxotrophe sowie Mutationen in Virulenzgenen) miteinander kombiniert und auf ihre Verträglichkeit bei menschlichen Freiwilligen getestet. Im Jahre 2004 führten Kotloff et al. zuletzt eine Phase-I-Verträglichkeitsstudie durch, in der sie zwei attenuierte *S. flexneri* 2a-Mutanten miteinander verglichen, von denen die eine nur eine auxotrophe Mutation (Δ *guaAB* (GMP-Synthase Untereinheit B)), die zweite zusätzlich Mutationen in Virulenz-assoziierten Enterotoxingenen (Δ *sen* (*Shigella*-Enterotoxin-1), und Δ *set* (*Shigella*-Enterotoxin-2)) trug. Es stellte sich heraus, daß entweder nur eine oder beide Mutationen in den Virulenzfaktorgenen erheblich zur besseren Verträglichkeit in den Probanden beitrugen, aber die Immunogenität leicht abnahm. Dies konnte wiederum durch die Möglichkeit einer höheren Applikationsdosis (10^9 CFU/Mensch) ausgeglichen werden (Kotloff et al. 2004). Ebenfalls im Jahre 2004 wurde der *S. flexneri* 2a Stamm SC602, der ausschließlich eine Mutation im Plasmid-lokalisierten *virG*-Gen trägt, an 34 Freiwilligen mit einer oralen Dosis von 10^4 CFU getestet, wobei ungefähr 10% der Behandelten Symptome einer milden Diarrhöe zeigten (Katz et al. 2004).

4.3.2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes ist ein Gram+, intrazelluläres Bakterium, das über die Nahrung aufgenommen wird und in Zellen des Wirts aufgrund der Expression von Listeriolysin den Phagosomen entkommen kann und sich im Zytoplasma der Zielzellen vermehrt, von wo aus eine Ausbreitung in umliegende Zellen stattfindet (Cossart & Mengaud 1989). Wegen des einzigartigen intrazellulären Lebenszyklus vermag eine Infektion mit Listerien eine breit gefächerte Immunantwort zu induzieren, einschließlich der Aktivierung neutrophiler Zellen, Makrophagen, CD4⁺- und CD8⁺T-Zellen und einer Vielzahl an Zytokinen, was in Mausmodellen nachgewiesen werden konnte [review in (Kaufmann 1993)].

Aufgrund der hohen Virulenz, vor allem bei schwangeren Frauen und immunsupprimierten Menschen, sind auch hier Attenuierungen in Form von Virulenzgen-Mutationen dringend erforderlich. In der ersten und bisher einzigen Phase-I-Studie, in der nur die Sicherheit einer *L. monocytogenes*-Mutante ($\Delta actA$ (actin nucleator A) und $\Delta plcB$ (Phospholipase B)) getestet wurde, erhielten 20 Freiwillige orale Dosen von 1×10^6 – 1×10^9 Bakterien. Die Verträglichkeit sowie die Dauer der Ausscheidung wurden beobachtet, was vor allem im Hinblick auf Sicherheitsaspekte in der Umwelt interessant ist. Keine der teilnehmenden Personen wies Zeichen einer Gastroenteritis oder einer systemischen Infektion auf; die Ausscheidung der verabreichten Keime endete bei allen nach 4 Tagen (Angelakopoulos *et al.* 2002). Eine Aussage über die Effektivität von attenuierten Listerien als DNA-Vehikel im Menschen kann zur Zeit nicht gemacht werden, da entsprechende Studien fehlen.

4.3.3. *Salmonella* spp.

Salmonellen wurden schon früh als rekombinante Vehikel für Antigene eingesetzt (Curtiss, III 2002). Zu den ersten attenuierenden Mutationen, die untersucht wurden, zählen hier Defekte in der Synthese aromatischer Aminosäuren (Hoiseth & Stocker 1981), zu denen auch die *aroA*-Deletion von *S. typhimurium* SL7207 zählt.

Aus der Reihe der Salmonellen wird der Stamm Ty21a (*Salmonella enterica* Serovar Typhi) als einziges bakterielles Lebend-Vakzin gegen Typhus eingesetzt, ist jedoch nur schwach immunogen und genetisch undefiniert, was ihn als AG-Vehikel ungeeignet macht. Ausgehend von weiteren virulenten Stämmen von *S. typhi* wurden mittlerweile jedoch einige neue Mutanten durch Gendeletionen attenuiert und ihre Immunogenität und Verträglichkeit als Typhus-Vakzin in klinischen Phase I- und II-Studien bestätigt (Tacket *et al.* 2000), (Khan

et al. 2003). Ein Stamm aus dieser Reihe, ZH9 (Δ aroC (Chorismat-Synthase), Δ ssaV (Komponente des Typ III Sekretionsapparates von Salmonellen)), wurde im Jahr 2003 als Vehikel für die *heat-labile toxin* Untereinheit B (LT-B) von *E. coli* an 36 Freiwilligen auf seine Verträglichkeit, Immunogenität und Effektivität als Vakzin gegen enterotoxigene *E. coli* (ETEC) getestet. Die Impfungen wurden von allen Testpersonen gut vertragen, und in 70% der behandelten Personen stellte sich eine Serokonversion zum Antigen nach zwei oralen Dosen ein (Pressemitteilung (Microscience Ltd. 2003)), was diesen Stamm zu einem vielversprechenden Kandidaten bei der Nutzung als Vakzin und AG-Vehikel macht.

Trotz ihrer längeren intestinalen Aufenthaltsdauer und der damit verbundenen potentiell stärkeren Induktion einer Immunantwort wurden Salmonellen des Serovars Typhimurium relativ spät als AG-Vehikel zum Einsatz am Menschen in Betracht gezogen. Erst im Jahre 2000 wurde der Stamm LH1160 (Δ phoPQ (Zwei-Komponenten-Operon-System, das für die Expression verschiedener Virulenz-Gene verantwortlich ist), Δ purB (Adenylosuccinat Lyase)) als erstes, von *S. typhimurium* abgeleitetes Vakzin in einer klinischen Studie eingesetzt (Angelakopoulos & Hohmann 2000). Die Einführung eines für *ureAB* aus *Helicobacter pylori* kodierenden Plasmids sollte eine Anti-UreAB-Immunantwort induzieren, was auch bei 50% der Testpersonen in Form einer Antikörper-Produktion eintrat. Die zweimal oral applizierten Dosen lagen zwischen 5×10^7 und 8×10^7 , was bei einigen der geimpften Freiwilligen zur Entwicklung eines niedrigen Fiebers führte, niemand klagte jedoch über Beschwerden wie Diarrhöe.

Studien mit *S. typhimurium* zur Verträglichkeit und zur Bestimmung der Effektivität als AG-Vehikel beschränkten sich in den letzten fünf Jahren jedoch vorwiegend auf präklinische *in vivo*-Arbeiten und einige, wenn auch sehr erfolgreiche Versuche im Primatenmodell (Evans *et al.* 2003), was zur Folge hat, daß zur Zeit nur recht wenige klinische Studien laufen.

Ein anderer interessanter Aspekt, den Einsatz von Salmonellen in der Krebstherapie betreffend, soll hier nicht unerwähnt bleiben: die fakultativ anaeroben Bakterien zeigen einen natürlichen Tropismus gegenüber soliden Tumoren und vermögen diese sogar zu kolonisieren, was sie zu interessanten Kandidaten für die selektive Applikation von Chemotherapeutika macht (Review in (Pawelek *et al.* 2003). Hierzu zählen die Abgabe von therapeutischen Agenzien (wie IL-2) (Saltzman *et al.* 1997) oder auch das Einbringen Prodrug-aktivierender Enzyme ins Tumormilieu (King *et al.* 2002).

4.3.4. Sind Salmonellen als Antigen-DNA-Vehikel geeignet?

Beim Einsatz von Salmonellen als Antigen-DNA-Träger ist nach wie vor die Frage des genauen Mechanismus der DNA-Weitergabe in der Zielzelle (APC) ungeklärt (Roland *et al.* 2005). Salmonellen verbleiben nach der Phagozytose, im Gegensatz zu beispielsweise Listerien und Shigellen, innerhalb der Phagosomen der Zellen und vermehren sich dort (Alpuche-Aranda *et al.* 1994); es wurde lange Zeit vermutet, daß sie deshalb als Antigen-DNA-Träger nicht zur Induktion einer Immunantwort geeignet sind. Für AG, die unter bakterieller Promotorkontrolle stehen, konnte gezeigt werden, daß die Präsentation von Epitopen in MHC-Klasse-I-Molekülen nach Infektion mit Salmonellen in den endosomalen Vakuolen ihren Ursprung nimmt. Diese Vermutung wird durch Versuche belegt, in denen sowohl TAP-defiziente als auch TAP-exprimierende Makrophagen mit rekombinanten Bakterien des Stammes *S. typhimurium*, die ein für Ovalbumin kodierendes Plasmid trugen, infiziert wurden. Die Effektivität der AG-Präsentation in MHC-Klasse-I fiel in den TAP-defizienten Makrophagen nur geringfügig weniger effizient aus (Wick & Pfeifer 1996). Darji *et al.* gelang es 1997, eine erfolgreiche Expression des verwendeten Reportergens *lacZ* unter Kontrolle des eukaryotischen CMV-Promotors nach einer oralen Impfung mit plasmidtragenden Bakterien des Stammes *Salmonella typhimurium* SL7207 nachzuweisen, also dem Stamm, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Darji *et al.* 1997). Der genaue Mechanismus des Transports der bakteriellen Plasmid-DNA aus den Endosomen heraus in den Zellkern der Wirtszelle ist nach wie vor ungeklärt.

Auf dem Gebiet der Tumor-DNA-Vakzinierung konnten Paglia *et al.* 1998 erstmals nach oraler Impfung mit plasmidtragenden *S. typhimurium* $\Delta aroA$ (3-Phosphoshikimat-1-carboxyvinyltransferase) eine protektive Immunität *in vivo* gegen ein murines Fibrosarkom zeigen (Paglia *et al.* 1998). Bisher wurden ausschließlich Bakterien des Stammes *S. typhimurium*, die eine *aroA*-Deletion tragen, als DNA-Impfstoff-Vehikel in der anti-Tumor-Vakzinierung *in vivo* eingesetzt: beim Melanom (als TAA dienten hier gp100 und *tyrosinase-related protein 2*, TRP-2) (Xiang *et al.* 2000), (Niethammer *et al.* 2001), beim Kolon- und Lungen-Adenokarzinom (hier wurde als TAA das *human carcinoembryonic antigen* (CEA) eingesetzt) (Xiang *et al.* 2001) und beim Nierenkarzinom, wo als Modell-AG β -Galaktosidase in einem β -Gal-exprimierenden Tumormodell eingesetzt wurde (Zoller & Christ 2001). In allen bisher durchgeführten *in vivo*-Studien konnten zelluläre Immunantworten (vermittelt durch CD4⁺T- und/oder CD8⁺T-Zellen), die gegen die jeweils eingesetzten Tumorentitäten gerichtet waren, induziert werden. Meist gelang es, diese

Antitumor-Antworten noch durch den Einsatz ko-stimulatorischer Moleküle wie CD40L oder IL-2 zu steigern.

Diese Ergebnisse, ebenso wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Rückschluß zu, daß die Antigen-DNA aus dem Phagosom an die Zielzellen weitergegeben und exprimiert wird. In dieser Arbeit konnte dies durch die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort gezeigt werden, die ohne eine Expression der Minigen-DNA in den Wirtszellen gar nicht möglich wäre.

Dennoch ließe sich die Ausschleusung der bakteriellen Impfstoff-DNA aus den Salmonellen ins Zytosol der Zielzellen optimieren, indem man sich die Fähigkeit eines anderen intrazellulären Pathogens, die Phagosomenmembran der Wirtszelle aktiv zu zerstören und so dem phagosomalen Abbau zu entkommen, zunutze macht: *Listeria monocytogenes* ist ein Gram-positives Bakterium, das aufgrund der Expression des Zytolysins Listeriolysin O (LLO), welches durch das Gen *hly* kodiert wird, die Phagosomenmembran infizierter Wirtszellen zu perforieren und sich so in das Zytoplasma auszubreiten vermag (Portnoy *et al.* 1992), (Cossart & Lecuit 1998). Catic *et al.* konnten 1998 *in vitro* erstmals zeigen, daß Salmonellen des Stammes SL7207 durch ein chromosomal integriertes *hly*-Gen (SL7207-Hlys) wesentlich effektivere CD8⁺T-Zell-Antworten gegen das Modell-AG OVA zu induzieren vermochten als der nicht-rekombinante Ausgangsstamm (SL7207) (Catic *et al.* 1999).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die klinische Anwendung von attenuierten Bakterien als AG-Vehikel eine vielversprechende Strategie zur adjuvanten Therapie von Krebserkrankungen ist. Die relativ geringen Fortschritte, die in den letzten Jahren ihre Nutzung betreffend gemacht wurden, sind einerseits auf enttäuschende Immunogenitätsprofile bereits bekannter, attenuierter Vakzin-Kandidaten für den Einsatz am Menschen zurückzuführen. Andererseits erschwert das Fehlen geeigneter, übertragbarer Tiermodelle die Evaluation von Sicherheit und Immunogenität der Vakzine, was in einigen Fällen zeigte, daß eine im Mausmodell ausreichende Attenuierung im menschlichen Wirt diesen Ansprüchen nicht entsprach.

Besonders in der Tumorimmunologie gewinnt diese Strategie aber immer mehr an Bedeutung, da viele Tumorentitäten aufgrund ihrer schwachen Immunogenität *per se* keine Immunantwort auslösen, hierzu gehört auch das Neuroblastom. Einen stark immunogenen Stimulus liefern pathogen-assoziierte Muster (PAMP = *pathogen-associated molecular*

patterns), die das angeborene Immunsystem durch Kontakt zu TLRs (*Toll-like receptors*) aktivieren. Hierzu zählen neben Oberflächenmolekülen von Pathogenen (Lipopolysaccharide, Flagellin, Peptidoglykane) immunmodulatorische, unmethylierte CpG-Motive bakterieller DNA (Medzhitov & Janeway, Jr. 2000), (Krieg 2002), die durch Induktion eines Th1-*shifts* einen starken zusätzlichen Stimulus für das adaptive Immunsystem liefern (Iwasaki & Medzhitov 2004). Die Vakzinierungsstrategie unter Verwendung attenuierter Bakterien als Vehikel für ein DNA-Vakzin birgt außerdem den Vorteil einer zusätzlichen Stimulation des angeborenen Immunsystems, welche u.a. die Ausschüttung verschiedener Zytokine nach sich zieht, wie z.B. IL-12, TNF- α und IFN- γ (Dietrich *et al.* 2003), wovon letzteres dafür bekannt ist, nicht nur eine Heraufregulation der MHC-Klasse-I-Gen-Expression zu induzieren sondern auch die anderer Gene, deren Produkte am Aufbau des Immunoproteasoms beteiligt sind (York *et al.* 1999). Um die periphere T-Zell-Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen zu durchbrechen, sind diese zusätzlichen Adjuvanzfunktionen, die von attenuierten Lebend-Impfstoffen ausgehen, von entscheidender Bedeutung.

Die weit gefächerten Anwendungsmöglichkeiten für attenuierte Bakterien im allgemeinen und für Salmonellen im speziellen sprechen dafür, sie intensiv für adjuvante Strategien zur Krebstherapie in Betracht zu ziehen.

4.4. Ausblick - Tyrosinhydroxylase-DNA-Vakzine in der Klinik?

4.4.1. Applikationsmöglichkeiten des Impfstoffs

Das Ziel der biomedizinischen Forschung ist es natürlich, für die im Labor und anschließend *in vivo* getestete Substanz einen Weg in die Klinik zu finden. Für das Neuroblastom, dessen Behandlungsmöglichkeiten nach wie vor begrenzt erfolgreich sind, ist die Suche nach innovativen, neuen Therapieansätzen erforderlich. Die Tatsache, daß sich in den letzten 20 Jahren an der 5-Jahres-Überlebensrate von am Stadium-4-Neuroblastom erkrankten Kindern nichts Wesentliches geändert hat, würde einen Einsatz eines auf der Tyrosinhydroxylase basierenden DNA-Vakzins in der Klinik mehr als rechtfertigen.

Die Applikation betreffend können unterschiedliche Möglichkeiten in betracht gezogen werden, beispielsweise bei der Wahl der Applikationsform und des Applikationsweges. DNA-Vakzine können in verschiedenen Formen appliziert werden: als nackte DNA geschieht dies zumeist intradermal oder intramuskulär, wobei die für das Antigen kodierende Plasmid-

DNA von APCs aufgenommen und exprimiert wird. Ein Nachteil dieser Methode ist die sehr ineffiziente Aufnahme in die Zelle, die es nötig macht, sehr große Mengen an Plasmid-DNA zu injizieren, um eine starke Immunantwort zu induzieren (Wolff *et al.* 1990), (Nichols *et al.* 1995). DNA kann auch mit Hilfe der sog. *gene gun* appliziert werden (Klein *et al.* 1992). Hierzu werden Mikropartikel, z.B. Goldkügelchen, mit der jeweiligen DNA beladen (*coating*) und mit Hilfe einer Pistole in das jeweilige Gewebe „geschossen“. Diese Methode hat einen effizienteren Eintritt der DNA ins Zytoplasma der Zellen zur Folge, da die Zellmembran durch die hohe Fluggeschwindigkeit einfach penetriert wird. Es sei hier angemerkt, daß diese Methode je nach persönlichem Empfinden mehr oder weniger schmerzhaft ist, was natürlich ein Nachteil in der Klinik sein kann.

Am effizientesten erscheint zur Zeit die Applikation eines Impfstoffes, die eine mukosale Immunantwort nach sich zieht. Die mukosale Oberfläche (Schleimhäute) des Menschen ist mit einer Gesamtfläche von ca. 400 m² den Umwelteinflüssen ständig ausgesetzt und stellt die letzte Barriere gegen Pathogene dar. Die in den Mukosa-assoziierten lymphoidalen Geweben (MALT = *mucosa-associated lymphoid tissues*) lokalisierten Immunzellen bilden das mukosale Immunsystem, wobei spezialisierte Epithelzellen, auch Membran-Zellen oder M-Zellen genannt, für die Aufnahme von Pathogenen (= Antigenen) und deren „Weitergabe“ an APCs verantwortlich sind (Bilsborough & Viney 2004). So kann über den Einsatz attenuierter Lebendimpfstoffe (*attenuated live vaccines*) als Vehikel für DNA-Vakzine über eine orale, nasale (oder auch vaginale/rektale) Aufnahme sozusagen der Kontakt der Antigene mit APCs der geimpften Person provoziert werden, was letztendlich die Voraussetzung für die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort ist.

4.4.2. Mögliche Therapieanwendungen

Nach der Applikationsart stellt sich die Frage nach einem sinnvollen Zeitpunkt der Applikation eines DNA-Vakzins. Die Ergebnisse aus den in dieser Arbeit vorgestellten *in vivo*-Versuchen lassen vermuten, daß eine Reduktion des Tumorwachstums am ehesten durch eine prophylaktische Behandlung erreicht wird. Dies würde aber eine präventive Impfung aller Kleinkinder bedeuten, was aufgrund der niedrigen Inzidenz, mit der das Neuroblastom auftritt, doch eher unangebracht erscheint.

Für therapeutische Ansätze jedoch, vor allem was das disseminierte Stadium 4 betrifft, muß abgewogen werden, wann ein Therapiebeginn am sinnvollsten wäre, also bereits zum

Diagnose-Zeitpunkt oder erst nach erfolgter Tumorresektion. Für ersteres würden die Daten sprechen, die wir aus den durchgeführten *in vivo*-Experimenten erhalten haben. Bei einem bereits sehr stark fortgeschrittenen Tumorwachstum liegt demnach die Vermutung nahe, daß eine Applikation des Impfstoffs zum Diagnosezeitpunkt keinen großen Einfluß auf selbiges hätte (Abschnitt 3.10). Allerdings könnte ein früher Zeitpunkt der Impfung die Bildung tumorspezifischer CTLs induzieren, die dann beispielsweise nach erfolgter Operation im Blutkreislauf kursierende Tumorzellen erkennen und vernichten könnten. Dies würde einem der größten Probleme in der Therapie des Neuroblastoms, der hohen Rezidivrate, entgegenwirken, was nüchtern betrachtet nur das Ziel einer solchen adjuvanten Neuroblastomtherapie sein kann.

Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muß, ist die Vereinbarkeit einer DNA-Vakzinierung mit anderen gängigen Therapien, wie z.B. chemotherapeutischen Ansätzen, bei denen es nicht nur zum lokalen Absterben von Tumorzellen, sondern auch zu einer allgemein zytostatischen Wirkung auf alle proliferierenden Zellen (wie Knochenmark, Haut, Haare etc.) kommt. Diese Supprimierung wirkt sich natürlich auch auf Immunzellen aus, die sich in teilendem Zustand befinden, also lymphozytäre Vorläuferzellen im Knochenmark, aber sicherlich auch naive CD8⁺-T-Lymphozyten, die nach Erkennung eines spezifischen Antigens zur Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen angeregt werden. Inwiefern sich solche kombinierten Behandlungsstrategien antagonisieren könnten, bleibt abzuwarten. Hinweise darauf könnten durch *in vitro*-Zytotoxizitätsassays gewonnen werden: beispielsweise ist es denkbar, einen wie in dieser Arbeit vorgestellten Cr51-Assay mit Splenozyten aus mit mTH3-Minigen-DNA geimpften Mäusen durchzuführen, die während der Reaktivierungsphase mit bestrahlten Targetzellen unter Zugabe verschiedener in der Klinik eingesetzter Zytostatika kultiviert werden. Hier sollten sich im anschließenden Assay die möglichen unterschiedlichen Effekte auf das Lyse-Verhalten der CTLs zeigen.

Denkbar wäre auch der Einsatz eines auf der TH-basierenden DNA-Impfstoffes nach dem Ende einer Therapie, also nach erfolgter Tumorresektion und/oder Chemotherapie. Zu einem Zeitpunkt, zu dem sich das Immunsystem des Patienten wieder regeneriert hat, wäre auch mit einer besseren Verträglichkeit von bakteriellen *Carriern* zu rechnen, die für immungeschwächte Patienten sicherlich eine Belastung darstellen würden. Das Immunsystem könnte in Form von induzierten Gedächtnis-CD8⁺T-Zellen so auf nach der Therapie verbleibende Mikrometastasen reagieren, sie an ihrer Ausbreitung hindern bzw.

zerstören. Alles in allem erscheint der zuletzt genannte Applikationszeitpunkt am realistischsten und für die Patienten am verträglichsten zu sein.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der nicht außer Acht gelassen werden darf, ist der Umstand, daß es sich beim in dieser Arbeit vorgestellten Vakzin letztlich um ein Selbst-AG handelt. Obwohl eine gegen das Selbst gerichtete Immunantwort im hier vorgestellten Mausmodell nicht eintrat, kann die Situation im Menschen wieder ganz anders aussehen. Wenn dies der Fall ist, muß ganz klar der Vorteil einer vielleicht erfolgreichen Senkung der Rezidivrate der Krebserkrankung gegen die Schwere der Nebenwirkungen abgewogen werden.

5. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der am weitesten verbreitete solide, extrakranielle Tumor im Kindesalter. Trotz jahrzehntelanger Forschung und immer wieder erweiterten Therapieprotokollen sind die Überlebensraten von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorwachstum nach wie vor schlecht. Die Entwicklung neuer, innovativer adjuvanter Therapiestrategien ist unumgänglich. Die Idee, eine zelluläre, langanhaltende Immunantwort im Körper zu induzieren, vermittelt durch zytotoxische CD8⁺T-Zellen, die sich gegen den Tumor richten, scheint dabei besonders attraktiv. Als tumorassoziiertes Antigen (TAA) wurde zu diesem Zweck für diese Arbeit die murine Tyrosinhydroxylase (mTH), das Schrittmacherenzym der Katecholaminbiosynthese, gewählt, da sie in der Mehrzahl der Neuroblastome stark überexprimiert ist und aufgrund dessen auch als Diagnose-Marker verwendet wird.

Die Überwindung der Selbsttoleranz des Immunsystems sollte durch den Einsatz sog. DNA-Minigen-Vakzine, die für Peptide aus der mTH-Sequenz kodieren, induziert werden. Die Auswahl der aus der mTH-Sequenz stammenden Minigen-Peptide basierte auf dem MHC-Klasse-I-Liganden-Vorhersageprogramm *syfpeithi*, welches für das in dieser Arbeit verwendete *in vivo*-Mausmodell drei vorhergesagte starke H2-K^k-Liganden lieferte. So entstand das mTH-DNA-Minigen *mTH3kepis* im Vektor pCMV-F3Ub. Parallel dazu wurde ein DNA-Vakzin erzeugt (*Ersatzepis*-pCMV-F3Ub), welches für drei Peptide kodiert, die zuvor als tatsächliche H2-K^k-Liganden auf den *in vivo* verwendeten Neuroblastomzellen NXS2 identifiziert wurden. Zur erfolgreichen Induktion eines proteasomalen Abbaus, die Voraussetzung für die Präsentation von AG-Peptiden in MHC-Klasse-I, vermittelt das Vektordesign die Bildung eines Ubiquitin (Ub)-Minigen-Fusionspeptids, in dem die C-terminale AS des Ub zu Ala₇₆ mutiert ist.

Die Applikation der DNA-Vakzine erfolgte unter Nutzung attenuierter Bakterien des Stammes *Salmonella typhimurium* SL7207. Die Plasmid-tragenden Bakterien dienten somit nicht nur als DNA-Vehikel und oraler Impfstoff, sondern bieten den entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Applikationsformen, daß sie durch ihre hohe Immunogenität zusätzlich im Rezipienten eine Aktivierung des mukosalen Immunsystems vermitteln.

Die Effektivität der Impfstoffe, eine gegen das Neuroblastom gerichtete Immunantwort zu induzieren, wurde *in vivo* in einem syngenem Mausmodell getestet, wobei sowohl der Effekt

auf das subkutane Tumorwachstum als auch die Fähigkeit, Lebermetastasen zu verhindern, untersucht wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die *in vivo* durch das mTH-Minigen-DNA-Vakzin induzierte Antitumor-Antwort durch CD8⁺T-Zellen vermittelt wird. Weiterhin konnte in *in vitro*-Zytotoxizitätsassays nachgewiesen werden, daß die *in vivo* induzierten zytotoxischen T-Zellen die drei mTH-Peptide spezifisch auf Neuroblastomzellen und auf mit den mTH-Peptiden gepulsten Nicht-Neuroblastomzellen, die die mTH selber nicht exprimieren, erkennen und beide Zellarten zu lysieren vermögen. Parallel wurden zwei äquivalente Minigen-DNA-Vakzine hergestellt, die sich durch die Expression eines Wildtyp-Ub-Gly₇₆ von den beiden Ub-Ala₇₆-Minigen-Plasmiden unterschieden. Der Einsatz dieser Wildtyp-Ub-DNA-Vakzine *in vivo* vermittelte keine Reduktion des subkutanen Tumorwachstums und keine Verhinderung von Lebermetastasen, was die Abhängigkeit einer effektiven Antitumor-Immunantwort vom Vektordesign beweist.

Auch in einem therapeutisch angelegten *in vivo*-Versuch vermochte das mTH3-Minigen-Vakzin, eine gegen das Neuroblastom gerichtete Immunantwort zu induzieren, die sich aufgrund des sehr aggressiven Tumormodells weniger auf das subkutane Tumorwachstum auswirkte als vielmehr die Inhibierung von Lebermetastasen vermittelte.

Zusätzlich und insbesondere interessant für eine eventuelle klinische Anwendung eines auf der TH basierenden DNA-Vakzins verursachte das mTH-Minigen-Vakzin zumindest in Mäusen keine Aktivierung selbst-reaktiver CD8⁺T-Zellen, was durch die Abwesenheit dieser Lymphozytenpopulation in Nebennieren geimpfter Mäuse nachgewiesen werden konnte.

Alles in allem lassen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse den Schluß zu, daß sich die Tyrosinhydroxylase als TAA in Form eines DNA-Vakzins zur adjuvanten Therapie des Neuroblastoms eignet. Desweiteren kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, daß der Einsatz sog. Minigen-DNA-Vakzine, die nur für wenige vorhergesagte, aber hoch affine MHC-Klasse-I-Liganden kodieren, keinen Nachteil gegenüber der Verwendung der Gesamtsequenz eines TAA haben. Außerdem sollte die Übertragbarkeit dieser Strategie auf andere Tumorentitäten, nämlich unter Zuhilfenahme geeigneter MHC-Klasse-I-Vorhersageprogramme, DNA-Impfstoffe zur Induktion einer CD8⁺T-Zell-vermittelten Immunantwort herzustellen, in Betracht gezogen werden.

6. Summary

To break self-tolerance of the cellular immune system against antigens overexpressed by tumor cells, without induction of pathogenic autoimmunity, is an important strategy in cancer immunotherapy. A need for the development of such effective alternative treatment strategies in addition to “classical” therapy in pediatric oncology is emphasized in stage 4 neuroblastoma. Neuroblastoma is a pediatric cancer derived from sympathetic nervous tissue characterized by a dismal prognosis, despite novel developments such as high dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation, passive immunotherapy and differentiation therapy. Thus, the development of a vaccine to activate the cellular arm of the immune system, specifically CD8⁺ T-cells, which seem to be best equipped to eliminate tumor cells, may provide a therapeutic element complementary to established neuroblastoma therapy.

Neuroblastoma cells are derived from sympathetic neuroblasts and therefore express high amounts of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH), the first step enzyme in catecholamine biosynthesis. The expression of TH and the down stream tumor-associated biochemical pathway differentiates neuroblastoma from other tissues similar to tyrosinase driven melanin synthesis in melanoma. Based on these considerations and the fact that catecholamine production and metabolism is a well-established clinical marker for diagnosis and follow-up of neuroblastoma patients, we reasoned that TH may be a useful antigen for vaccination against neuroblastoma.

A critical role for effective vaccination and priming of CD8⁺T cells plays the “danger signal” also provided by the innate immune system. Therefore, DNA vaccination remains a promising approach combining high versatility in specific vaccine design with activation of the innate immune system and DCs mediated by Toll-like receptors stimulated by non-methylated CpG motifs. An important element to enhance the efficacy of a DNA vaccine is an appropriate delivery to the host’s immune system. For this purpose, the plasmids encoding for a particular immunogen can be applied as an oral vaccine using attenuated, nonreplicating *Salmonella typhimurium* (SL7207) as a carrier in order to transport the DNA vaccine into the GI tract of the patients providing a huge mucosal surface. Here, the innate and subsequently also the adaptive immune system is mediated by the bacterial cell wall (LPS) and the bacterial DNA (non-methylated CpG motifs), leading to the production of cytokines such as IL1, IL6 or IL12 and other mediators such as nitric oxide which drive a T_H1-type cellular immune response against the antigen encoded in the DNA vaccine.

Based on these considerations, we designed a TH-derived DNA minigene vaccine encoding for peptides with high predicted binding affinity to MHC class I, and showed an effective therapeutic anti-neuroblastoma immune response using *Salmonella typhimurium* SL7207 as a vaccine carrier. Furthermore, the response was demonstrated to depend on the vector design providing for a stable minigene-ubiquitin fusion peptide by insertion of a mutated ubiquitin gene (G76 to A76). In cytotoxicity assays the induced immune response could be clearly shown to be mediated by mTH-specific CD8⁺T cells. Furthermore, our DNA vaccine encoding for self antigens did not induce an anti-self-directed immune response in mice, an important observation for further clinical applications

In summary, these preclinical data provide an import baseline for the design of clinical trials. Additionally, this work showed the efficacy of MHC-class-I prediction programs like *syfpeithi* to offer the potential of creating small DNA vaccines that encode for only a few but highly affine CD8⁺T cell ligands out of the whole protein sequence of a tumor associated antigen. Therefore, this method should be considered to be transferred on other tumor entities.

Literaturverzeichnis

- 't Veer LJ, Beijersbergen RL & Bernards R [1993](#) N-myc suppresses major histocompatibility complex class I gene expression through down-regulation of the p50 subunit of NF-kappa B. *EMBO J.* [12](#) [195-200](#).
- Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA & Miller SI [1994](#) Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J.Exp.Med.* [179](#) [601-608](#).
- Amerik AY & Hochstrasser M [2004](#) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim.Biophys.Acta* [1695](#) [189-207](#).
- Angelakopoulos H & Hohmann EL [2000](#) Pilot study of phoP/phoQ-deleted Salmonella enterica serovar typhimurium expressing Helicobacter pylori urease in adult volunteers. *Infect.Immun.* [68](#) [2135-2141](#).
- Angelakopoulos H, Looch K, Sisul DM, Jensen ER, Miller JF & Hohmann EL [2002](#) Safety and shedding of an attenuated strain of Listeria monocytogenes with a deletion of actA/plcB in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect.Immun.* [70](#) [3592-3601](#).
- Bachmair A, Finley D & Varshavsky A [1986](#) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* [234](#) [179-186](#).
- Baker RT, Tobias JW & Varshavsky A [1992](#) Ubiquitin-specific proteases of Saccharomyces cerevisiae. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *J.Biol.Chem.* [267](#) [23364-23375](#).
- Bilsborough J & Viney JL [2004](#) Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* [127](#) [300-309](#).
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D & Schmidt M [1999](#) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat.Cell Biol.* [1](#) [221-226](#).
- Burrows GG, Ariail K, Celnik B, Gambee JE, Bebo BF, Jr., Offner H & Vandenbark AA [1996](#) Variation in H-2K(k) peptide motif revealed by sequencing naturally processed peptides from T-cell hybridoma class I molecules. *J.Neurosci.Res.* [45](#) [803-811](#).
- Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM & Bona CA [1997](#) Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J.Exp.Med.* [186](#) [1481-1486](#).
- Catic A, Dietrich G, Gentschev I, Goebel W, Kaufmann SH & Hess J [1999](#) Introduction of protein or DNA delivered via recombinant Salmonella typhimurium into the major histocompatibility complex class I presentation pathway of macrophages. *Microbes.Infect.* [1](#) [113-121](#).
- Christinck ER, Luscher MA, Barber BH & Williams DB [1991](#) Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* [352](#) [67-70](#).
- Corr M, Lee DJ, Carson DA & Tighe H [1996](#) Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J.Exp.Med.* [184](#) [1555-1560](#).

- Cossart P & Lecuit M [1998](#) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* **17** [3797-3806](#).
- Cossart P & Mengaud J [1989](#) *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol.Biol.Med.* **6** [463-474](#).
- Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL & Rock KL [1997](#) Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J.Biol.Chem.* **272** [13437-13445](#).
- Curtiss R, III [2002](#) Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J.Clin.Invest* **110** [1061-1066](#).
- Darji A, Guzman CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, Chakraborty T & Weiss S [1997](#) Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91** [765-775](#).
- Dietrich G, Spreng S, Favre D, Viret JF & Guzman CA [2003](#) Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr.Opin.Mol.Ther.* **5** [10-19](#).
- Drew PD, Lonergan M, Goldstein ME, Lampson LA, Ozato K & McFarlin DE [1993](#) Regulation of MHC class I and beta 2-microglobulin gene expression in human neuronal cells. Factor binding to conserved cis-acting regulatory sequences correlates with expression of the genes. *J.Immunol.* **150** [3300-3310](#).
- Ecker DJ, Stadel JM, Butt TR, Marsh JA, Monia BP, Powers DA, Gorman JA, Clark PE, Warren F, Shatzman A. [1989](#) Increasing gene expression in yeast by fusion to ubiquitin. *J.Biol.Chem.* **264** [7715-7719](#).
- Evans DT, Chen LM, Gillis J, Lin KC, Harty B, Mazzara GP, Donis RO, Mansfield KG, Lifson JD, Desrosiers RC, Galan JE & Johnson RP [2003](#) Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the *Salmonella* type III secretion antigen delivery system. *J.Virol.* **77** [2400-2409](#).
- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ & Schreiber SL [1995](#) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268** [726-731](#).
- Finch JS, Bonham K, Krieg P & Bowden GT [1990](#) Murine polyubiquitin mRNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **18** [1907](#).
- Fruci D, Lauvau G, Saveanu L, Amicosante M, Butler RH, Polack A, Ginhoux F, Lemonnier F, Firat H & van Ender PM [2003](#) Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport. *J.Immunol.* **170** [2977-2984](#).
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC & Robinson HL [1993](#) DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** [11478-11482](#).
- Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA & Finley D [1998](#) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94** [615-623](#).

- Goldsby RE & Matthey KK [2004](#) Neuroblastoma: evolving therapies for a disease with many faces. *Paediatr.Drugs* **6** [107-122](#).
- GPOH and Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. www.kinderkrebsinfo.de [2004](#).
- Grant EP, Michalek MT, Goldberg AL & Rock KL [1995](#) Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J.Immunol.* **155** [3750-3758](#).
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD & Huber R [1997](#) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386** [463-471](#).
- Handgretinger R, Anderson K, Lang P, Dopfer R, Klingebiel T, Schrappe M, Reuland P, Gillies SD, Reisfeld RA & Neithammer D [1995](#) A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur.J.Cancer* **31A** [261-267](#).
- Handgretinger R, Baader P, Dopfer R, Klingebiel T, Reuland P, Treuner J, Reisfeld RA & Niethammer D [1992](#) A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol.Immunother.* **35** [199-204](#).
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL & Rose IA [1980](#) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77** [1783-1786](#).
- Hoiseth SK & Stocker BA [1981](#) Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291** [238-239](#).
- Holmgren J & Czerkinsky C [2005](#) Mucosal immunity and vaccines. *Nat.Med.* **11** [45-53](#).
- Holzthutter HG, Frommel C & Kloetzel PM [1999](#) A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J.Mol.Biol.* **286** [1251-1265](#).
- Huang, X and Miller, W. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* **12**[3], [337-357](#). [2004](#). Elsevier.
- Huebener N, Lange B, Lemmel C, Rammensee HG, Strandsby A, Wenkel J, Jikai J, Zeng Y, Gaedicke G & Lode HN [2003](#) Vaccination with minigenes encoding for novel 'self' antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma. *Cancer Lett.* **197** [211-217](#).
- Iwasaki A & Medzhitov R [2004](#) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* **5** [987-995](#).
- Katz DE, Coster TS, Wolf MK, Trespalacios FC, Cohen D, Robins G, Hartman AB, Venkatesan MM, Taylor DN & Hale TL [2004](#) Two studies evaluating the safety and immunogenicity of a live, attenuated Shigella flexneri 2a vaccine (SC602) and excretion of vaccine organisms in North American volunteers. *Infect.Immun.* **72** [923-930](#).
- Kaufmann SH [1993](#) Immunity to intracellular bacteria. *Annu.Rev.Immunol.* **11** [129-163](#).

- Khan SA, Stratford R, Wu T, Mckelvie N, Bellaby T, Hindle Z, Sinha KA, Eltze S, Mastroeni P, Pickard D, Dougan G, Chatfield SN & Brennan FR [2003](#) Salmonella typhi and S typhimurium derivatives harbouring deletions in aromatic biosynthesis and Salmonella Pathogenicity Island-2 (SPI-2) genes as vaccines and vectors. *Vaccine* **21** [538-548](#).
- Kiessling R, Klein E, Pross H & Wigzell H [1975a](#) "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur.J.Immunol.* **5** [117-121](#).
- Kiessling R, Klein E & Wigzell H [1975b](#) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur.J.Immunol.* **5** [112-117](#).
- King I, Bermudes D, Lin S, Belcourt M, Pike J, Troy K, Le T, Ittensohn M, Mao J, Lang W, Runyan JD, Luo X, Li Z & Zheng LM [2002](#) Tumor-targeted Salmonella expressing cytosine deaminase as an anticancer agent. *Hum.Gene Ther.* **13** [1225-1233](#).
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM & Goldberg AL [1999](#) The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J.Biol.Chem.* **274** [3363-3371](#).
- Klein RM, Wolf ED, Wu R & Sanford JC [1992](#) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology* **24** [384-386](#).
- Kloetzel PM [2001](#) Antigen processing by the proteasome. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2** [179-187](#).
- Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL & Finley D [2001](#) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol.Cell* **7** [1143-1152](#).
- Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, Nataro JP, Wasserman SS, Sztein MB, Picking WD & Levine MM [2004](#) Deletion in the Shigella enterotoxin genes further attenuates Shigella flexneri 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J.Infect.Dis.* **190** [1745-1754](#).
- Krieg AM [2002](#) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu.Rev.Immunol.* **20** [709-760](#).
- Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J & Marrack P [2000](#) Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288** [675-678](#).
- Kubitscheck U, Levi R, Horwitz RJ, Arnon R & Pecht I [1992](#) Peptide binding to class I molecules of the major histocompatibility complex on the surface of living target cells. *Scand.J.Immunol.* **36** [341-348](#).
- Laney JD & Hochstrasser M [1999](#) Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* **97** [427-430](#).
- Lode HN, Handgretinger R, Schuermann U, Seitz G, Klingebiel T, Niethammer D & Beck J [1997a](#) Detection of neuroblastoma cells in CD34+ selected peripheral stem cells using a combination of tyrosine hydroxylase nested RT-PCR and anti-ganglioside GD2 immunocytochemistry. *Eur.J.Cancer* **33** [2024-2030](#).

-
- Lode HN, Pertl U, Xiang R, Gaedicke G & Reisfeld RA [2000](#) Tyrosine hydroxylase-based DNA-vaccination is effective against murine neuroblastoma. *Med.Pediatr.Oncol.* [35](#) [641-646](#).
- Lode HN, Xiang R, Dreier T, Varki NM, Gillies SD & Reisfeld RA [1998](#) Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. *Blood* [91](#) [1706-1715](#).
- Lode HN, Xiang R, Duncan SR, Theofilopoulos AN, Gillies SD & Reisfeld RA [1999](#) Tumor-targeted IL-2 amplifies T cell-mediated immune response induced by gene therapy with single-chain IL-12. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* [96](#) [8591-8596](#).
- Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD & Reisfeld RA [1997b](#) Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J.Natl.Cancer Inst.* [89](#) [1586-1594](#).
- Mayer A, Siegel NR, Schwartz AL & Ciechanover A [1989](#) Degradation of proteins with acetylated amino termini by the ubiquitin system. *Science* [244](#) [1480-1483](#).
- Medzhitov R & Janeway C, Jr. [2000](#) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* [8](#) [452-456](#).
- Microscience Ltd., [1-12-2003](#). www.emergentbiosolutions.com
- Miyajima Y, Kato K, Numata S, Kudo K & Horibe K [1995](#) Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA. *Cancer* [75](#) [2757-2761](#).
- Mollenkopf H, Dietrich G & Kaufmann SH [2001](#) Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. *Biol.Chem.* [382](#) [521-532](#).
- Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, Perry HC, Friedman A, Martinez D, Ulmer JB, Donnelly JJ & Liu MA [1993](#) Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* [12](#) [777-783](#).
- Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV & Troilo PJ [1995](#) Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* [772](#) [30-39](#).
- Niethammer AG, Xiang R, Ruehlmann JM, Lode HN, Dolman CS, Gillies SD & Reisfeld RA [2001](#) Targeted interleukin 2 therapy enhances protective immunity induced by an autologous oral DNA vaccine against murine melanoma. *Cancer Res.* [61](#) [6178-6184](#).
- Norda M, Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G & Rammensee HG [1993](#) Comparison of the H-2Kk- and H-2Kkm1-restricted peptide motifs. *J.Immunother.* [14](#) [144-149](#).
- Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA & Colombo MP [1998](#) Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* [92](#) [3172-3176](#).
- Pawelek JM, Low KB & Bermudes D [2003](#) Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol.* [4](#) [548-556](#).

- Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Gaedicke G, Reisfeld RA & Lode HN [2001](#) IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J.Immunol.* **166** 6944-6951.
- Pession A, Libri V, Sartini R, Conforti R, Magrini E, Bernardi L, Fronza R, Olivotto E, Prete A, Tonelli R & Paolucci G [2003](#) Real-time RT-PCR of tyrosine hydroxylase to detect bone marrow involvement in advanced neuroblastoma. *Oncol.Rep.* **10** 357-362.
- Pircher H, Moskophidis D, Rohrer U, Burki K, Hengartner H & Zinkernagel RM [1990](#) Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature* **346** 629-633.
- Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W & Cossart P [1992](#) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect.Immun.* **60** 1263-1267.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA & Stevanovic S [1999](#) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50** 213-219.
- Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P & Amigorena S [1999](#) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat.Cell Biol.* **1** 362-368.
- Rodriguez F, Zhang J & Whitton JL [1997](#) DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J.Virol.* **71** 8497-8503.
- Roland KL, Tinge SA, Killeen KP & Kochi SK [2005](#) Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. *Curr.Opin.Mol.Ther.* **7** 62-72.
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH & White DE [1998](#) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat.Med.* **4** 321-327.
- Saltzman DA, Katsanis E, Heise CP, Hasz DE, Vigdorovich V, Kelly SM, Curtiss R, III, Leonard AS & Anderson PM [1997](#) Antitumor mechanisms of attenuated *Salmonella typhimurium* containing the gene for human interleukin-2: a novel antitumor agent? *J.Pediatr.Surg.* **32** 301-306.
- Sandberg JK, Franksson L, Sundback J, Michaelsson J, Petersson M, Achour A, Wallin RP, Sherman NE, Bergman T, Jornvall H, Hunt DF, Kiessling R & Karre K [2000](#) T cell tolerance based on avidity thresholds rather than complete deletion allows maintenance of maximal repertoire diversity. *J.Immunol.* **165** 25-33.
- Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U & Kloetzel PM [2000](#) Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J.Exp.Med.* **191** 503-514.
- Sizemore DR, Branstrom AA & Sadoff JC [1997](#) Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* **15** 804-807.

- Soza A, Knuehl C, Groettrup M, Henklein P, Tanaka K & Kloetzel PM 1997 Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Lett.* **413** 27-34.
- Spierings DC, Agsteribbe E, Wilschut J & Huckriede A 2000 Characterization of antigen-presenting properties of tumour cells using virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br.J.Cancer* **82** 1474-1479.
- Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, Kloetzel PM & Holzhtutter HG 2000 Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur.J.Biochem.* **267** 6221-6230.
- Stryhn A, Pedersen LO, Romme T, Holm CB, Holm A & Buus S 1996 Peptide binding specificity of major histocompatibility complex class I resolved into an array of apparently independent subspecificities: quantitation by peptide libraries and improved prediction of binding. *Eur.J.Immunol.* **26** 1911-1918.
- Sun Y, Sijts AJ, Song M, Janek K, Nussbaum AK, Kral S, Schirle M, Stevanovic S, Paschen A, Schild H, Kloetzel PM & Schadendorf D 2002 Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res.* **62** 2875-2882.
- Swiss Institute of Bioinformatics. BLAST-Sequenzabgleich. 2004. <http://www.expasy.ch/tools/blast/>
- Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ & Eisen HN 1996 Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* **4** 565-571.
- Tacket CO, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky G, Kotloff KL, Wyant TL, Nataro JP, Edelman R, Perry J, Bedford P, Brown D, Chatfield S, Dougan G & Levine MM 2000 Phase 2 clinical trial of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral live vector vaccine CVD 908-htrA in U.S. volunteers. *Infect.Immun.* **68** 1196-1201.
- Tissot AC, Ciatto C, Mittl PR, Grutter MG & Pluckthun A 2000 Viral escape at the molecular level explained by quantitative T-cell receptor/peptide/MHC interactions and the crystal structure of a peptide/MHC complex. *J.Mol.Biol.* **302** 873-885.
- Tuting T, DeLeo AB, Lotze MT & Storkus WJ 1997 Genetically modified bone marrow-derived dendritic cells expressing tumor-associated viral or "self" antigens induce antitumor immunity in vivo. *Eur.J.Immunol.* **27** 2702-2707.
- van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM & Ossendorp F 2000 Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J.Exp.Med.* **192** 483-494.
- Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, Elmishad AG, Kloetzel PM, Higgins T, Ciccarelli RB, Evans M, Man S, Smith L & Kast WM 2001 Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J.Immunol.* **166** 5366-5373.
- Vijay-Kumar S, Bugg CE & Cook WJ 1987 Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **194** 531-544.
- Watanabe N, Arase H, Onodera M, Ohashi PS & Saito T 2000 The quantity of TCR signal determines positive selection and lineage commitment of T cells. *J.Immunol.* **165** 6252-6261.

- Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC & Hill CP 2000 Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408** 115-120.
- Wick MJ & Pfeifer JD 1996 Major histocompatibility complex class I presentation of ovalbumin peptide 257-264 from exogenous sources: protein context influences the degree of TAP-independent presentation. *Eur.J.Immunol.* **26** 2790-2799.
- Wilkinson KD 1997 Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* **11** 1245-1256.
- Wing SS 2003 Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **35** 590-605.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A & Felgner PL 1990 Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247** 1465-1468.
- World Health Organisation (WHO). World Health Organisation (WHO). <http://www.who.int/en/> 2004.
- Xiang R, Lode HN, Chao TH, Ruehlmann JM, Dolman CS, Rodriguez F, Whitton JL, Overwijk WW, Restifo NP & Reisfeld RA 2000 An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 5492-5497.
- Xiang R, Primus FJ, Ruehlmann JM, Niethammer AG, Silletti S, Lode HN, Dolman CS, Gillies SD & Reisfeld RA 2001 A dual-function DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and CD40 ligand trimer induces T cell-mediated protective immunity against colon cancer in carcinoembryonic antigen-transgenic mice. *J.Immunol.* **167** 4560-4565.
- Yang S, Vervaert CE, Burch J, Jr., Grichnik J, Seigler HF & Darrow TL 1999 Murine dendritic cells transfected with human GP100 elicit both antigen-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity. *Int.J.Cancer* **83** 532-540.
- Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Fuchs C & Germain RN 2000 The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* **404** 506-510.
- York IA, Goldberg AL, Mo XY & Rock KL 1999 Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol.Rev.* **172** 49-66.
- Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF & Sprent J 1998 Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity.* **8** 591-599.
- Zoller M & Christ O 2001 Prophylactic tumor vaccination: comparison of effector mechanisms initiated by protein versus DNA vaccination. *J.Immunol.* **166** 3440-3450.

Anhang

Publikationen:

1. Paper

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Huebener N, Lange B, Lemmel C, Rammensee HG, Strandsby A, Wenkel J, Jikai J, Zeng Y, Gaedicke G, Lode HN (2003).

Vaccination with minigenes encoding for novel 'self' antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma.

Cancer Letters, 18;197(1-2):211-7

Erst- und Mitautorenschaften (geordnet nach Erscheinungsjahr):

Zeng Y, **Huebener N**, Fest S, Weixler S, Schroeder U, Gaedicke G, Xiang R, Schramm A, Eggert A, Reisfeld RA, Lode HN. *Fractalkine (CX3CL1) and IL-2 enriched neuroblastoma microenvironment induces eradication of metastases mediated by T- and NK-cells.* Cancer Res, *in revision*

Fest S, **Huebener N**, Weixler S, Bleeke M, Zeng Y, Strandsby A, Volkmer-Engert R, Landgraf C, Gaedicke G, Riemer AB, Michalsky E, Jaeger IS, Preissner R, Förster-Wald E, Jensen-Jarolim E, Lode HN. *Characterization of GD2 Peptide Mimotope DNA Vaccines Effective against Spontaneous Neuroblastoma Metastases.* Cancer Res 2006; 66: (21). November 1, 2006, *in press*

Zeng Y, Jiang J, **Huebener N**, Wenkel J, Gaedicke G, Xiang R, Lode HN. *Fractalkine gene therapy for neuroblastoma is more effective in combination with targeted IL-2.* Cancer Lett. 2005 Oct 18;228(1-2):187-93. Review

Lode HN, **Huebener N**, Zeng Y, Fest S, Weixler S, Gaedicke G. *DNA minigene vaccination for adjuvant neuroblastoma therapy.* Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec;1028:113-21. Review

Lange B, Schroeder U, **Huebener N**, Jikai J, Wenkel J, Strandsby A, Wrasidlo W, Gaedicke G, Lode HN. *Rationally designed hydrolytically activated etoposide prodrugs, a novel strategy for the treatment of neuroblastoma*. Cancer Lett. 2003 Jul 18;197(1-2):225-30.

Jikai J, Shamis M, **Huebener N**, Schroeder U, Wrasidlo W, Wenkel J, Lange B, Gaedicke G, Shabat D, Lode HN. *Neuroblastoma directed therapy by a rational prodrug design of etoposide as a substrate for tyrosine hydroxylase*. Cancer Lett. 2003 Jul 18;197(1-2):219-24.

Huebener N, Lode HN. *AACR Special Conference in cancer research: ubiquitination in normal and cancer cells*. Expert Opin Biol Ther. 2003 Feb;3(1):187-92.

Schroeder U, Bernt KM, Lange B, Wenkel J, Jikai J, Shabat D, Amir R, **Huebener N**, Niethammer AG, Hagemeyer C, Wiebusch L, Gaedicke G, Wrasidlo W, Reisfeld RA, Lode HN. *Hydrolytically activated etoposide prodrugs inhibit MDR-1 function and eradicate established MDR-1 multidrug-resistant T-cell leukemia*. Blood. 2003 Jul 1;102(1):246-53. Epub 2003 Mar 6.

Wrasidlo W, Schroder U, Bernt K, **Huebener N**, Shabat D, Gaedicke G, Lode H. *Synthesis, hydrolytic activation and cytotoxicity of etoposide prodrugs*. Bioorg Med Chem Lett. 2002 Feb 25;12(4):557-60.

2. Vorträge

Mai 2006:

- *Advances in Neuroblastoma Research (ANR)*, Los Angeles, USA
- *XIX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung* in Wilsede, Deutschland

2005:

- *XVIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung* in Wilsede, Deutschland

2004:

- *Advances in Neuroblastoma Research (ANR)*, Genua, Italien

2003:

- *14th European Students Conference (ESC)*, Berlin
- *62. Tagung der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)* in Wien, Österreich
- *XVI. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung* in Wilsede, Deutschland

2002:

- *XV. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung* in Wilsede, Deutschland

2001:

- *XIV. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung* in Wilsede, Deutschland

3. Posterpräsentationen

Mai 2006:

- *Advances in Neuroblastoma Research (ANR)*, Los Angeles, USA

2005:

- *New Approaches to Vaccine Development*, Symposium, Berlin, Deutschland

2004:

- *DNA Vaccines 2004 - The Gene Vaccine Conference*, Monaco, Monte Carlo
- *100. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin*, Berlin, Deutschland

2003:

- *45th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH)*, San Diego, USA

2002:

- *Advances in Neuroblastoma Research (ANR)* in Paris, Frankreich

- *American Association Cancer Research (AACR)*, Special Conference: Ubiquitination in Normal and Cancer Cells in Vancouver, Kanada

4. Preise

Mai 2006:

- *Young Investigator Research Fellowship* im Rahmen des Kongresses *Advances in Neuroblastoma Research 2006*, Los Angeles, USA

Berlin im September 2006

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Chef Holger Lode, der mir nicht nur die Arbeit in seiner AG ermöglichte, sondern mir auch auf vielen Gebieten jede erdenkliche Gestaltungsmöglichkeit gab. Die damit einhergehenden Aufgaben sowie die Verantwortung, die er mir übertrug, möchte ich nicht missen, da ich so nicht nur das ausgezeichnete Arbeitsumfeld genießen, sondern auch viele eigene Ideen einbringen konnte, auch und vor allem was Aufgaben im Laborumfeld betraf. Auch im größten Klinikstreß und trotz widriger Umstände hat er mich immer unterstützt, mir mit seinem Rat zur Seite gestanden und mich zu neuen Ideen inspiriert. Außerdem danke ich ihm dafür, daß er mich gelehrt hat, daß selbst fünfmal korrigierte Manuskripte es immer noch wert sind, verbessert zu werden ☺, but as we all know: Life is not easy!

Herrn Prof. Gaedicke möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung und seine uneingeschränkte Unterstützung danken, aber vor allem auch dafür, daß er immer ein offenes Ohr und ein Lächeln für mich hatte, egal, um welches Problem es sich handelte oder wie viel Papier sich auf seinem Schreibtisch türmte. Ich sage nur: Nordish by nature!

Ein sehr großer Dank gilt auch meinem Doktorvater Herrn Prof. Kloetzel vom Institut für Biochemie der Humboldt-Universität Berlin, der bereitwillig meine Betreuung übernahm und der große Geduld mit mir bewies und nun doch ein Manuskript erhält, daß etwas mehr als 100 Seiten umfasst.

Bei Prof. Olaf Witt vom DKFZ Heidelberg bedanke ich mich für die kurzfristige Bereitschaft, mein Drittgutachter zu werden!

Nun komme ich zu meiner Labcrew: ich danke allen, die mich während meiner Zeit hier an der Charité begleitet haben. Viele kamen und gingen, alle werden vermisst! Mein besonderer Dank gilt hierbei:

Fr. Yan Zeng („Zeng-Lao she“), die mir nicht nur in Laborfragen immer wieder hilfreich zur Hand ging (you know: my brain!), sondern mir in den letzten Jahren eine sehr gute Freundin

geworden ist und mich auch in schlechten Zeiten immer unterstützt hat, und das nicht nur mit Ratschlägen.

Fr. Anne Strandsby, meiner ersten TA, danke ich für ihre Arbeitseinstellung, die so gar nicht „TA-gemäß“ war. Ich denke da nur an die Nächte und Wochenenden, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben. Auch sie ist mir in den vier Jahren, die wir uns kennen, eine liebe Freundin geworden, mit der ich nicht nur über Persönliches sondern auch über Gott und die Welt reden konnte, was nicht selten in lebhaften Diskussionen endete.

Bei Stefan Fest möchte ich mich bedanken, daß er mich an meine Grenzen geführt hat, und das nicht nur vom intellektuellen Standpunkt aus. Mit ihm konnte das kleinste Problem Auslöser für tiefergehende Diskussionen sein, was in unserem Forscheralltag essentiell ist, wie wir nur zu gut wissen. Mir die Freuden der Statistik nahezubringen, ist eine fast unlösbare Aufgabe, ich weiß, trotzdem hat er es immer wieder hartnäckig versucht und teilweise auch mit Erfolg! Außerdem ist die Welt durch ihn um eine mathematische Formel reicher geworden (Schleiz'sche Volumeformel). Und Stefan: Auch wenn Du derzeit in der Ferne weilst: ich erwarte Dich zurück in unseren (Forschungs-) Gefilden!

Bei allen anderen im Labor Lode (Anja-Asterix, the-Artist-also-known-as Steffi, Silke und Matthias-the-coffee-junkie), die zurzeit die Stellung halten, und den Ex's (Ulrike, Björn, Jens, Kerstin) möchte ich mich für das kollegiale Klima bedanken. Wir hatten auch schwierige Zeiten durchzustehen, aber am Ende raufen wir uns zusammen. Und nur das zählt!

Allen anderen Mitarbeitern, die ich in meiner Zeit im Forschungshaus kennenlernen durfte, danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und die Chats im Flur! Auch wenn wir in diesem Haus alle noch an unserem Zugehörigkeitsgefühl arbeiten können (was uns durch die Arbeitssituation nicht immer leicht gemacht wird), habe ich doch den Eindruck gewonnen, daß die meisten an einem Strang ziehen. Das ist der einzig richtige Weg!

Bei Constantin (samt Spodo) und Susann möchte ich mich herzlich für das kritische Gegenlesen meiner Arbeit bedanken, was nie „nur“ ein Vergnügen ist, wie ich aus eigener Erfahrung weiß! Bei Kerstin, Anja W., meiner guten Freundin, und Anja E. möchte ich mich für Ihr „formales Adlerauge“ bedanken, welches einige, mir völlig unerklärliche (☺) Rechtschreibfehler und seltsame Abbildungsnummerierungen aufdeckte.

Und noch eine Person, die mich dazu inspiriert hat, den „naturwissenschaftlichen Pfad“ einzuschlagen, soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben: mein Chemie-Lehrer Herr Riegel!

So, S.! Wie Du siehst, hat es endlich geklappt mit mir! Aber Geduld ist ja bekanntlich eine Tugend. Ich danke Dir für Deine Unterstützung in allen Lebenslagen, Dein offenes Ohr, unsere Freundschaft, die bereits ein Studium und die letzten Jahre überlebt hat. Ich denke, das sind gute Voraussetzungen...;-)!

Zum Ende bleibt mir nur noch eins zu sagen: Bei meiner Familie (Papa und Muddles, Knolle und Bärchi, Sassy, Frodo und Sam) bedanke ich mich, daß sie mir immer einen Rückzugsort geboten haben, an den ich jedes Mal aufs Neue gerne zurückkehre! Mein besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, ohne die dies alles hier gar nicht möglich gewesen wäre!

Versicherung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst zu haben und alle Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche gekennzeichnet zu haben. Desweiteren versichere ich, daß die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Berlin im September 2006